



Jonna Pukki

Manuaalisen ja automaattisen skannauksen ja analyysin vertailu kudisleikkeen FISH:ssa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

15.3.2024

Tiivistelmä

Tekijä(t):	Jonna Pukki
Otsikko:	Manuaalisen ja automaattisen skannauksen ja analyysin vertailu kudosleikkeen FISH:ssa
Sivumäärä:	34 sivua + 1 liite
Aika:	15.3.2024
Tutkinto:	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma:	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaaja(t):	Lehtori Heidi Malava Sairaalageneetikko Elina Kaikkonen

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata automaattisen ja manuaalisen FISH-skannauksen ja analyysin yhdenmukaisuutta. Vertailu suoritettiin skannaamalla ja analysoimalla automaattimenetelmällä aiemmin manuaalisesti analysoituja näytteitä ja vertailemalla saatuja tuloksia kvalitatiivisesti. Vertailussa arvioitiin tulosten yhdenmukaisuutta, automaattisen menetelmän toimivuutta histologisille näytteille sekä etäyhteyksien ja tiedon siirron toimivuutta. Tavoitteena oli myös löytää menetelmän haasteet ja kehityskohdat, sekä pohtia ratkaisuja ongelmiin. Manuaalisen ja automaattisen analyysin tuloksista laadittiin taulukko, jonka avulla tuloksia vertailtiin. Vertailun tulokset kuvailtiin myös sanallisesti ja pohdittiin tulosten merkitystä analyysin laatuun ja käytännön työhön. Opinnäytetyö tehtiin Hus Diagnostiikkakeskuksen genetiikan laboratoriolle.

Vertailun tulosten perusteella todettiin kudosleikkeen rakenteen ja hybridisaation onnistumisen vaikuttavan automaattiskannauksen ja analyysiohjelman tuloksiin. Hyvälaatuisissa näytteissä soluja pysyttiin analysoimaan vaivattomasti useita satoja, haasteellisissa näytteissä alhaisimmillaan alle 10 solua. Analyysien tulokset olivat yhdenmukaisia pos/neg-tasolla niiltä osin kun analyysin pystyi suorittamaan. Kuudestatoista vertailunäytteestä automaattinen analyysi pystyttiin tekemään 13 näytteelle (81 %), kolmessa näytteessä ei havaittu signaaleja annotoidulla alueella. Vertailun tulosten yhdenmukaisuutta arvioitaessa huomioitiin annotoitujen leikkeiden erilaisuus verrattuna vertailunäytteisiin, sekä kasvainsolujen mahdollinen poisleikkautuminen vertailunäytteistä. Vertailun tulosten perusteella voidaan todeta automaattisen skannauksen ja analyysin sopivan lymfomakudosleikkeille. Analyysitulosten ollessa yhdenmukaisia voidaan analyysiohjelman tuloksia pitää luotettavana. On kuitenkin huomioitava menetelmän ja näytemateriaalin haasteet analyysia tehdessä. Kudoksen rakenteesta ja hybridisaation onnistumisesta riippuen analyysia on tehtävä myös manuaalisesti mikroskoipimalla, silloin kun näytteen laatu ei ole riittävä automaattiselle analyysille. Automaattilla ei voida täysin korvata ammattilaisen työskentelyä kudosleikkeen FISH-analyysissa.

Avainsanat: FISH, kudosleike, vertailu, histologia, genetiikka

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author(s): Jonna Pukki
Title: Comparison of automated and manual scanning and analyses in tissue-FISH
Number of Pages: 34 pages + 1 appendix
Date: 15 March 2024

Degree: Bachelor of health care
Degree Programme: Biomedical laboratory science
Instructor(s): Heidi Malava, lecturer
Elina Kaikkonen, Clinical Laboratory Geneticist

The purpose of this thesis was to compare automated and manual scanning and signal analysis of fluorescence in situ-hybridization, to test analyzing programs connections and communication and to discover the challenges and points of development of the method. Signals were compared focusing on consistency, and automated scanning method was assessed focused on reliability and functionality. Comparing was performed by scanning and analyzing FISH-tissue samples and comparing results to previously manually analyzed results. Consistency of results and functionality of the automated method on histological samples were assessed during the process. Challenges and targets of development were observed and discussed solutions to those observed problems. A table was made from the results, that assisted and clarified comparing. Results of comparing were analyzed qualitatively and described verbally. This thesis was made for Hus Diagnostic Centre, laboratory of genetics.

Based on the results of comparing, quality of tissue samples and hybridization will affect on automated scanning and results of the analysis. Tissues with good quality, it was possible to analyze effortlessly several hundreds of cells, and tissues with challenging structure and quality it was possible to analyze less than 10 cells. Results of the analysis were consistent on pos/neg-state as far as the analysis could be performed. 13 out of 16 samples were analyzed (81 %), in three samples there were no signals on the annotated area. Structural differences and possible cut-off of tumor cells were taken into account on assessing consistency of the results. Based on the results, Automated scanning and analysis was found to be suitable for analyzing FISH on lymphatic tissues. With the comparing results being consistent, results of the analysis can be considered reliable. It is important to take quality of samples and hybridization into account when analyzing samples. Manual analysis is still required when quality of samples or hybridization is not suitable for automated analysis. Automated methods cannot completely replace the work of a professional employee.

Keywords: FISH, tissue sample, comparing, histology, genetics

The originality of this thesis has been checked using Turnitin Originality Check service.

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Fluoresenssi in situ-hybridisaatio (FISH)	2
3	Kudosleikkeen FISH-prosessi	3
3.1	Kudoksen esikäsittely ja hybridisaatio	4
3.2	Kudosleikkeen tarkastelu ja analysointi	5
4	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	7
5	Opinnäytetyön toteutus	8
5.1	Aineisto	9
5.2	Näytteiden esikäsittely ja FISH	12
5.3	Näytteiden skannaus	13
5.4	Signaalien tarkastelu analyysiohjelmalla	15
6	Tulokset	20
6.1	Manuaalisen analyysin tulokset	20
6.2	Automaattisen analyysiohjelman tulokset	21
6.3	Tulosten tarkastelu ja vertailu	24
7	Pohdinta	26
7.1	Luotettavuus	29
7.2	Eettisyys	30
7.3	Ammatillinen kasvu	31
	Lähteet	32
	Liitteet	
	Liite 1. Analyysivertailutaulukko	

1 Johdanto

Fluoresenssi in situ-hybridisaatiolla (FISH) analysoidaan kromosomien rakenteen muutoksia, spesifit fluoresoivat koettimet hybridisoidaan näytteeseen ja muodostuvaa signaalia tarkastellaan fluoresenssimikroskoopilla. FISH on yleisesti käytössä oleva standardimenetelmä tutkittaessa ja diagnosoidessa sairauksien geneettisiä muutoksia. Menetelmän etuina ovat sen muokattavuus ja soveltuvuus erilaisiin mutaatioihin, sekä mahdollisuus käyttää erilaisia näytemateriaaleja. Kasvaindiagnostiikassa FISH on nopea ja monipuolinen menetelmä, jolla voidaan osoittaa muutoksia mikrodeleatioista koko kromosomin kokoiisiin muutoksiin. Analyysia voidaan tehdä myös automatisoidulla menetelmällä, joka vähentää työn kuormittavuutta, parantaa analyysin laatua, lisää analyysikapasiteettia ja nopeuttaa analyysia. (Chiecchio 2020.)

Opinnäytetyö tehtiin Hus Diagnostiikkakeskuksen genetiikan laboratoriolle. Tässä opinnäytetyössä jatkossa genetiikan laboratoriolle tarkoitetaan Hus Diagnostiikkakeskuksen genetiikan laboratoriota, ja patologian laboratoriolle Hus Diagnostiikkakeskuksen patologian laboratoriota. Genetiikan laboratoriossa tutkitaan synnynnäisiä sekä hankinnallisia muutoksia geeneissä, hankinnallisilla muutoksilla tarkoitetaan erilaisia sairauksia syntymän jälkeen. FISH:ta käytetään leukemioiden ja muiden pahanlaatuisten veritautien tutkimuksissa, kiinteiden kasvainten diagnostiikassa, tautien seurannassa sekä luuytimensiirron jälkeisen kimerismin selvityksessä. FISH:lla voidaan osoittaa myös kromosomien lukumäärän tai rakenteen poikkeavuuksia. Näytemateriaalina käytetään joko viljeltyjä tai fiksoituja soluja ja kudოსleikkeitä. Kudოსnäytteen FISH:ta käytetään lymfoomien ja kiinteiden kasvaimien diagnostiikassa, tautien seurannassa ja levinneisyyden tutkinnassa. Automatisoitua näytteen skannausta ja signaalintunnistusta käytetään genetiikan laboratoriossa sytologisille näytteille. Kudოსleikkeille menetelmää ei vielä ole automatisoitu.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata manuaalisesti analysoitujen FISH-näytteiden tuloksia automaattiskannauksen ja signaalintunnistuksen tuloksiin, sekä testata analyysiohjelman etäyhteyksiä. Vertailun tavoitteena oli kerätä tietoa automatisoidun menetelmän luotettavuudesta ja toimivuudesta kudოსleikkeillä, sekä menetelmän kehityskohdista ja haasteista. Kerätyn tiedon avulla genetiikan laboratorion on mahdollista verifioida kudოსnäytteiden automaattiskannaus potilasnäytteille. Automatisoitu menetelmä on käytössä osassa pohjoismaita, Suomessa menetelmää verifioidaan ja otetaan käyttöön ensimmäistä kertaa.

2 Fluoresenssi in situ-hybridisaatio (FISH)

Fluoresenssi in situ-hybridisaatio perustuu koettimien ja DNA:n spesifiin sitoutumiseen. Kaksijuosteisessa DNA:ssa juosteet kiinnittyvät toisiinsa emäsparien välisillä vetysidoksilla. Emäsparit ovat adeniini-tyymiini (A-T) ja guaniini-sytosiini (G-C). Emäspariutumissäännön mukaan emäkset pariutuvat aina vastinemästensä kanssa. DNA:n kaksijuosteisuus voidaan denaturoida eli purkaa esimerkiksi kuumentamalla tai kemiallisin menetelmin, ja rakenne palauttaa kaksijuosteiseksi jäädyttämällä. Koettimet suunnitellaan emäspariutumissäännön ja tutkittavan kohteen perusteella. Koettimien leimaamisella saadaan tutkimuksen kohde näkyviin, yleisimmin käytössä olevia leimoja ovat fluoresoivat, luminesenssi- ja värireaktion tuottavat leimat. FISH:ssa käytettävät fluoresoivat leimat ovat yleisimmin syaanivärejä, fluoreseiini-isotiosyanaattia ja rodamiiniväriä. (Haajanen & Pelkonen & Pärssinen & Suominen 2013: 20–21, 195–196, 203.) Hybridisaatiossa yksijuosteinen fluoresenssileimattu koetin kiinnittyy emäspariutumissäännön mukaisesti spesifiin kohtaan näytteen yksijuosteiseksi denaturoidussa DNA:ssa. (Chiecchio 2020).

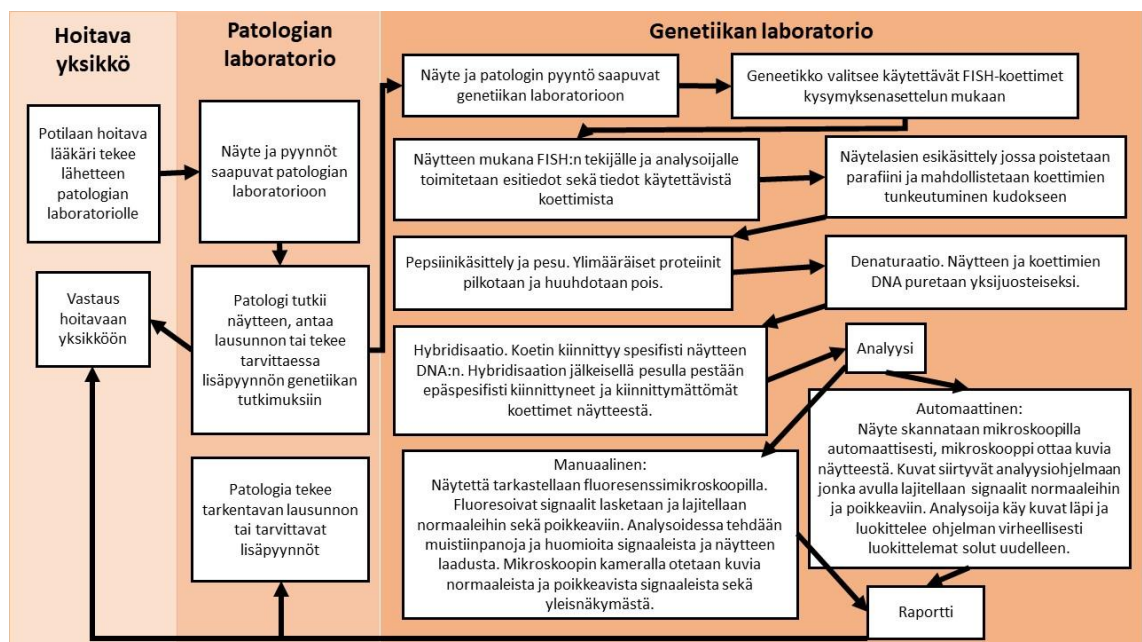
Tutkittaessa ja diagnosoidessa sairauksien geneettisiä muutoksia FISH:ta käytetään standardimenetelmänä. Syövän tunnetun geneettisen muutoksen tunnistus riittää usein hoidon aloittamiseen, ja menetelmällä saadaan tietoa kasvainkudoksesta. Kudokset ja kudosten FISH-analysissä saadaan tietoa primäärikasvaimen tai metastaasin solujen geneettisistä muutoksista. (Chrzanowska & Kowalewski & Lewandowska 2020.) FISH-analysin etuina geneettisissä tutkimuksissa ovat sen muokattavuus, soveltuvuus erilaisiin mutaatioihin ja käytettävyys erilaisissa näytemateriaaleissa. FISH:ta voidaan käyttää metafaasi- ja interfaasivaiheen soluille, osoittamaan muutoksia mikrodeleetoista koko kromosomin kokoihin muutoksiin. (Chiecchio 2020.) Sairaavat solut ja emäsluultaan pienet muutokset voidaan havaita FISH:n avulla helpommin kuin sytogenetiikan muilla menetelmillä. (Bhat & Wani 2017.)

FISH:ta käytetään sairauksien, kuten esimerkiksi syöpien, diagnostiikassa, ennusteen ja levinneisyyden arvioinnissa sekä sairauden remissiota tutkittaessa. Syöpädiagnostiikassa FISH on nopea ja monipuolinen menetelmä, jota voidaan käyttää sytologisten näytteiden lisäksi formaliinifiksoiduille kudoksenäytteille ja kudosten jääleikkeille. (Shakoori 2017.) Verrattaessa FISH:ta proteiinitason muutosten tunnistamiseen soveltuvaan immunohistokemiaan kiinteiden kasvainten tutkimuksissa sen etuja ovat helppous

ja nopea esivalmistelu, tulosten kvantitatiivisuus, koettimien spesifisyys, useiden muutosten yhtäaikainen tarkastelu sekä automatisoidun signaalien tarkastelun mahdollisuus. (Chrzanowska ym. 2020.)

3 Kudosleikkeen FISH-prosessi

Patologian ja genetiikan laboratorioiden sekä eri erikoisalojen lääkäreiden yhteistyöllä varmistetaan tutkimusten kohdistuminen täsmällisesti haluttuun kohteeseen. Yhteistyöllä saatuja tuloksia pystytään hyödyntämään tehokkaasti diagnosoidessa sekä hoitessa potilaita. (Kankainen & Kytölä & Ristimäki 2021.) Kudosnäytteen FISH- ja analysointiprosessi jakautuu usealle laboratoriolle ja terveydenhuoltoalan ammattilaiselle. Prosessia kuvataan kuviossa 1. Potilasta hoitava lääkäri käynnistää prosessin pyytämällä geneettisiä tutkimuksia, kuten FISH. Geneetikot (perinnöllisyystieteilijät) suunnittelevat käytettävät koettimet ja näytteille suoritetaan FISH sekä analyysi. Analyysin tulokset lausutaan pyytävälle lääkärille, joka tarvittaessa pyytää lisätutkimuksia.



Kuvio 1. FISH-prosessin kuvaus.

Tarve geneettisille tutkimuksille tarkentuu histologisen analyysin myötä, patologi lähettää näytteen tarpeen mukaan geneettisiin tutkimuksiin. Pyydetty tutkimus ja indikaatio määräytyy tutkimusten kohteena olevan sairauden mukaan. (Kankainen ym. 2021.) Histologinen näyte voidaan ottaa tähytyksessä koepalana, leikkauksen yhteydessä tai esimerkiksi luomen poistossa. Näyte käsitellään ja värjätään patologin lausuntoa var-

ten. Jotta kudosta ja sen rakennetta voidaan tarkastella mikroskoopissa, siitä on leikatava ohuita viipaleita. Näyte valetaan parafiiniin, joka tukee kudoksen rakennetta ja helpottaa leikkaamista. Leikkeet on myös värjättävä, koska väritöntä ohutta leikettä on hankala mikroskopoida rakenteiden heikon kontrastin vuoksi. Kudoksen värjäytyvyys perustuu väriaineen ja solujen kemiallisiin ominaisuuksiin, näin saadaan erotettua kudoksen rakenteet käyttämällä eri tavoin sitoutuvia väriaineita. Suomessa käytetään perusvärjäyksenä yleisimmin hematoksyliini-eosiinivärjäystä (HE), joka on hyvin säilyvä värjäys ja sillä saadaan solujen tumarakenteet erottumaan selkeästi. (Mäkinen 2023 a, b.) Jos kudoksesta löydetään taudin aiheuttamia muutoksia, patologi jatkaa näytteen tutkintaa ja selvittää taudin ominaisuuksia sekä pyytää tarvittavia lisätutkimuksia. Histologisilla tutkimuksilla voidaan taudin luokittelun lisäksi arvioida taudin etenemistä ja enustetta sekä suunnitella hoitoa. (Karttunen & Pääkkö 2013.)

3.1 Kudoksen esikäsittely ja hybridisaatio

Geneetikot suunnittelevat tutkimusindikaatioiden mukaan sopivat koettimet ja välittävät tiedon näytteen mukana FISH:n tekijälle. FISH-prosessin jälkeen näyte analysoidaan manuaalisesti tai automaattisesti, kirjataan analyysin tulokset raporttiin ja toimitetaan raportti ja mahdolliset lisätiedot geneetikoille. Analyysin tulosten perusteella voidaan tehdä tarvittaessa lisätutkimuksia eri koettimilla. Geneetikot antavat tuloksista lausunnon pyytävälle lääkärille.

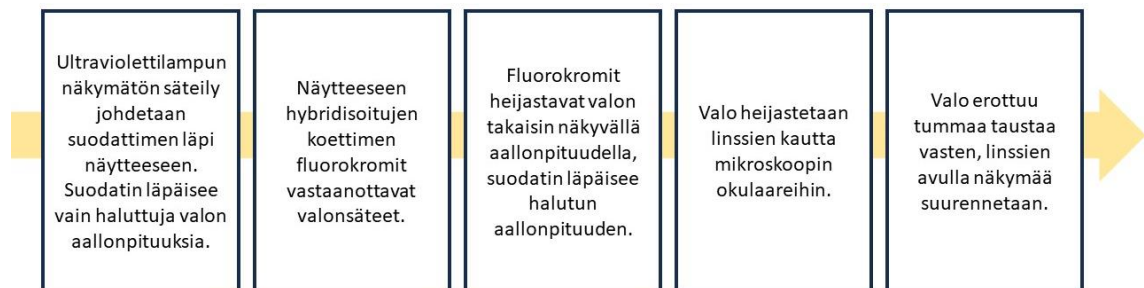
Histologisessa prosessissa kudosten rakenteen säilyttämiseksi suoritettu formaliini- ja parafiinikäsittely muodostaa aminohappojen välille rakenteita, jotka on purettava ennen muita käsittelyjä, jotta FISH:ssa käytetyt koettimet pääsevät sitoutumaan kohteeseensa. Purkaminen täytyy suorittaa vahingoittamatta tai muuttamatta kudoksen rakennetta. (Broeckx ym. 2013.) Purkaminen tapahtuu pepsiinikäsittelyssä. Pepsiini on entsyymi, joka pilkkoo proteiineja polypeptideiksi. (Terveyskirjasto 2016). Pepsiini toimii vain happamissa olosuhteissa ja 37°C lämpötilassa, näytteen pepsiinikäsittely tapahtuu lämpöhauteessa ja vetykloridiliuoksessa. Pepsiinikäsittelyn jälkeen näyte huuhdotaan SSC-puskuriliuoksella, joka tasaa näytteen pH:n ja huuhtoo pilkotut proteiinit näytteestä. SSC-puskuri on molekyylibiologiassa käytettävä suolaliuos, joka koostuu natriumnitraatista ja laboratoriolaatuisesta puhtaasta vedestä. (Sigma-Aldrich 2023).

Näytteen ja koettimen DNA:n rakenteet on denaturoitava eli purettava yksijuosteiseksi, jotta ne voivat kiinnittyä toisiinsa. Denaturaatio voidaan suorittaa käyttämällä korkeaa lämpötilaa tai hyvin emäksisiä olosuhteita. Denaturaatioaikaa on noudatettava tarkoin,

jotta DNA:n rakenteet eivät purkautu liikaa tai jää purkautumatta kokonaan. Denaturaatio pysäytetään jääkaappikylmällä liuoksella, joka tasaa näytteen pH:n. Liuoksen kylmyys estää juosteiden uudelleenkiinnittymisen. Hybridisaatio vaatii sopivat olosuhteet koettimien kiinnittymiseksi näytteen DNA:n. Lämpötila, hybridisaatiopuskuri ja käytettävien koettimien pituus vaikuttavat hybridisaation tuloksiin. Hybridisaation jälkeisellä pesulla huuhdotaan näytteestä kiinnittymättömät ja epäspesifisti kiinnittyneet koettimet. Pesuolosuhteiden lämpötila sekä suolapitoisuus vaikuttavat pesun tuloksiin. (Haajanen ym. 2013: 193–194, 203.)

3.2 Kudosleikkeen tarkastelu ja analysointi

Kudosleikkeeseen hybridisoituja fluoresoivia koettimia tarkastellaan fluoresenssimikroskoopilla. Mikroskoopin valonlähteenä on ultraviolettilamppu, jonka säteet ohjataan suodattimen läpi näytteeseen. Käytetyn koettimen fluorokromin lähettämän valon aallonpituus määrittää käytettävän suodattimen, suodatin läpäisee siis vain koettimen lähettämää aallonpituutta. Mikroskoopin valo kohdennetaan suodattimen läpi näytteeseen, jolloin fluorokromi emittoi vastaanottamaansa valoa näkyvällä aallonpituudella. Näytteeseen sitoutuneet koettimet erottuvat tummaa taustaa vasten kirkkaina ja näytteestä voidaan näin paikantaa sitoutuneet koettimet. (Solunetti 2006.) Fluoresenssimikroskoopin toimintaa kuvataan kuviossa 2.



Kuvio 2. Fluoresenssimikroskoopin toimintakuvaus.

Analysoidessa FISH-näytteitä mikroskopointi voidaan tehdä joko manuaalisesti tai automaattisten toimintojen avustamana. Automatisoidun skannauksen ja tietokoneohjelman avulla näytteet voidaan mikroskopoida ja skannata kuvatiedostoiksi automaattisesti. Skannatuista kuvista signaalit lasketaan käyttämällä analyysiohjelman algoritmeja. (Bode & Chea & Herzog & Pleiner & Schweizer & Tinguely 2021.) Manuaalisessa analyysissä fluoresoivat signaalit paikallistetaan näytteessä ja tarkastellaan signaaleja solu kerrallaan. Laboratoriot määrittävät itse laskettavien solujen määrän, toisen analysoijan tarpeen sekä rajat normaalin ja poikkeavan tuloksen välillä.

(Chrzanowska ym. 2020.) Käytännön työssä näytteen laatu huomioiden joudutaan kuitenkin joskus analysimaan pienempiä määriä soluja. FISH-analyysia optimoidessaan Bode ym. vertailivat automatisoitua näyttöiden skannausta ja signaalien laskentaa manuaaliseen menetelmään ja pohtivat erilaisten menetelmien etuja ja haasteita. Manuaalisessa signaalinlaskennassa tietokoneelle skannatuista kuvista analysoitiin signaalit sadasta solusta. Automatisoidussa analyysissa analyysiohjelmalla käytiin läpi merkattu alue ja ohjelma laski sekä lajitteli signaalit. Tuloksia vertaillessa todettiin että analyysiohjelma sai 42 näytteestä oikeat tulokset vain kolmesta. Signaalien analysoinnin virheellisyyteen vaikutti kudoksen tumien päällekkäisyys ja pakkautuminen lähekkäin, etenkin lymfaattisissa kudoksissa. Vertailun johtopäätöksenä Bode ym. totesivat että analyysiohjelma tarvitsee vielä algoritmien kehitystä jotta kudoksenäytteiden signaalien tunnistaminen onnistuisi oikein ja luotettavasti. Vertailun tekijät olivat kuitenkin tyytyväisiä automatisoinnin positiivisista vaikutuksista kuvien ja tulosten jakamiseen ja analysointiin etänä sekä muistikapasiteetin paranemiseen. Käytetyn skannerin ja analyysiohjelman toimintaan oltiin tyytyväisiä, laitteet ja ohjelma olivat luotettavia ja helppokäyttöisiä. (Bode ym.)

Digitaalisessa patologiassa diagnostiikkaan yhdistetään digitaalisia työkaluja, esimerkiksi skannerit, tietokoneet ja kamerat. Korkealaatuisia ja tarkkoja kuvia voidaan lähettää sovelluksien avulla laitteiden välillä ja kuvia voidaan analysoida automaattisilla ohjelmilla. Digipatologian avulla diagnostiikkaa ja konsultointia voidaan tehdä etänä. Tarkkojen ja spesifien analyysialgoritmien avulla analyysin laatu paranee, tunnistajien ja koodien lukeminen digitaalisesti vähentää tunnistusvirheitä ja kuvien käsittelyssä hyödynnettävä automatiikka nopeuttaa ja helpottaa kuvien käsittelyä. Etäyhteyksien ja digitaalisten kuvankäsittelyohjelmien avulla terveydenhuollon eri ammattilaiset voivat tarkastella ja tehdä merkintöjä kuvatiedostoihin, sekä tarkastella tehtyjä merkintöjä. Digipatologialla mahdollistetaan ja lisätään moniammatillista yhteistyötä, työn sujuvuutta ja kustannustehokkuutta. (Isola & Näpänkangas & Tolonen 2021.) Automaattiskannerin annotaatiotyökalun avulla patologi merkkää näytteestä edustavan alueen, jolla on mahdollisimman paljon kasvainsoluja. Jos analyysi tehdään alueelta, jossa geenimuutoksia on vain vähän, ei saada todenmukaista kuvaa muutosten ja terveiden solujen suhteesta. (Chrzanowska ym. 2020.)

Clement ym. validoivat lymfoomaan liittyvän *MYC*-translokaation koettimet käyttämällä digitaalista FISH-signaalien kuvaus- ja tarkasteluohjelmaa. Koetin LSI-MYC validoitiin 35 näytteellä, koetin IGH-MYC 40 näytteellä. Näytteinä käytettiin HE-värjättyjä kudosten leikkeitä, jotka analysoitiin manuaalisesti FISH:lla ja digitaalisesti GenASIs-ohjelmalla. HE-näytteistä merkattiin ohjelman annotaatiotyökalulla edustavat alueet ja kohdistettiin

FISH-näytteet merkattujen alueiden kanssa. Näytteet skannattiin ja analyysi suoritettiin kahdessa osassa, segmentointi ja luokittelu. Clement ym. huomasivat että analyysi oli virhealtis, johtuen virheellisestä tumien tunnistuksesta ja solujen päällekkäisyydestä. Manuaalista korjausta tarvittiin ennen tulosten hyväksyntää, korjaukseen kului noin 4 minuuttia näkökenttää kohden. Korjausten jälkeen tulosten yhdenmukaisuus oli 94 %. Tutkijat pitivät kuvien tallentamista ja helppoa uudelleentarkastelua tärkeänä. He mainitsivat myös prosessin digitalisoitumisen vaikutukset kustannuksiin, yhden fluoresenssi-mikroskoopi-analyysiohjelmayhdistelmän hinnan arvioitiin olevan kymmenkertainen manuaaliseen menetelmään verrattuna. (Clement & Liew & Miles & Rowe & Salama 2016.)

Hell ym. arvioivat tutkimuksessaan automaattisen FISH-analyysin soveltuvuutta *HER2*-geenitutkimukselle. *HER2*-positiiviset rintakudoksen karsinoomat voivat olla hoidettavissa trastuzumab-hoidolla, automatisoinnilla tavoiteltiin laadun parantamista analyysissä ja sopivan hoidon aloittamisen nopeutumista. Tutkimuksessa analysoitiin 100 rintasyöpänäytettä ja arvioitiin analyysin tuloksia. Automaattisen ja manuaalisen analyysin tulokset olivat 96 % yhdenpitäviä. Tutkimuksen tuloksia analysoidessa tutkijat ottivat huomioon näytteiden homogeenisuuden ja laadukkuuden, laadukkaiden näytteiden ansiosta saatiin luotettavia tuloksia. (Hell & Jochum & Kradoffer & Öhlschlegel 2013.) Automatisoidulla skannauksella ja signaalien tunnistuksella on mahdollista vähentää työn kuormittavuutta, parantaa laatua, lisätä analyysikapasiteettia ja nopeuttaa analyysia. Automaattisuus vaatii toimiakseen edustavat näytteet ja käytettävien menetelmien standardisoinnin. (Aust ym. 2019.)

4 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla manuaalisen ja automaattisen skannauksen tuloksia ja arvioida automaattisen skannauksen luotettavuutta, arvioida menetelmän soveltuvuutta histologisille näytteille, sekä tunnistaa menetelmän kehityskohteita ja haasteita. Vertailun tuloksia hyödynnetään otettaessa menetelmää käyttöön potilasnäytteiden analysoinnissa.

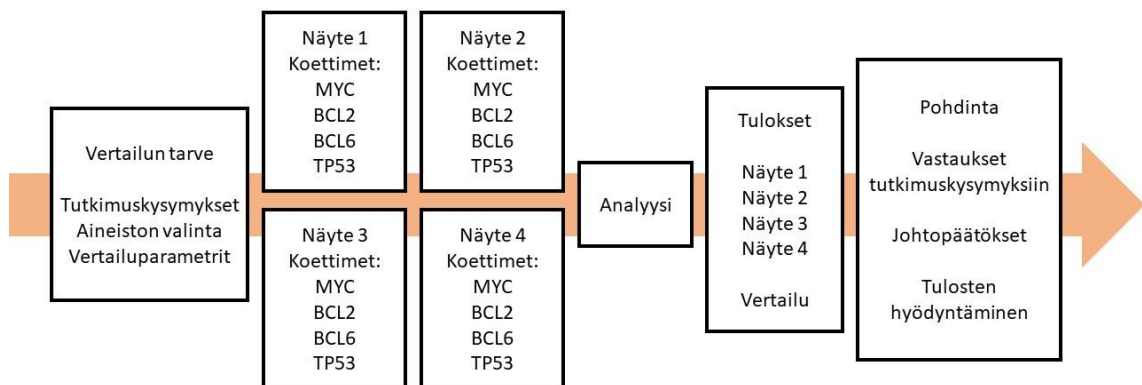
Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa genetiikan laboratoriolle tietoa menetelmän ja näyttemateriaalin yhteensopivuudesta, kehityskohteista ja haasteista sekä tulosten luotettavuudesta. Tavoitteena oli löytää toimimattomat ja parannettavat prosessin osat, sekä

pohtia ratkaisuja ongelmiin. Annotaatiotyökalun käytön aloituksen tavoitteena oli helpottaa tutkittavan alueen määrittystä ja havainnointia. Opinnäytetyötä ohjaavat tutkimuskysymykset olivat:

- eroaako manuaalisen ja automaattisen analyysin tulokset toisistaan?
- onko kudosleike sopiva materiaali automaattimenetelmälle?
- mitkä ovat automaattimenetelmän haasteita ja kehityskohteita?

5 Opinnäytetyön toteutus

Vertailunäytteiden skannaus ja analysointi suoritettiin käyttämällä Abbott Bioview Allegro Plus BX63 Automatic Motorized 8 Slide Scanneria, Abbott Bioview Solo Touch Workstationia, ja SoloWeb-ohjelmistoa 3.8.0.4. Bioview-ohjelmien, skannauksen ja analyysin perehdytys sekä optimointi kudosnäytteille järjestettiin laitteen edustajan ja valmistajan toimesta, perehdytykseen osallistui myös laboratorion henkilökuntaa. Perehdytyksen ja optimoinnin jälkeen aloitettiin vertailunäytteiden käsittely, analysointi ja tulosten raportointi. Opinnäytetyö toteutettiin tutkimuksellisenä kehitystyönä. Tutkimusasetelmakaaviossa (kuvio 3) kuvataan prosessin eteneminen.



Kuvio 3. Tutkimusasetelmakaavio.

Tutkimusasetelmakaaviossa kuvattu opinnäytetyöprosessi käynnistyi tarpeella tuottaa tietoa automaattisen menetelmän soveltuvuudesta kudosnäytteiden analysointiin. Tutkimuskysymykset muodostuivat vertailun parametrien ja käyttöönottoon tarvittavan tiedon perusteella. Aineiston valinta perustui koettimien ja näytemateriaalin suureen käytöstäesteseen kasvindiagnostiikassa. Vertailunäytteille tehtiin fluoresenssi in situ-hybridi-

disaatio samalla menetelmällä kuin rutiininäytteille, ja analyysi suoritettiin automaattisella menetelmällä. Tuloksia vertailtiin näytteiden aiempiin manuaalisen analyysin tuloksiin.

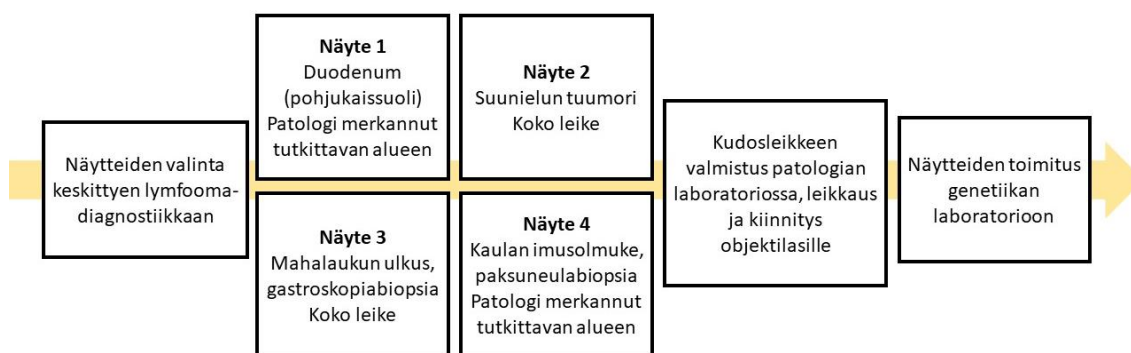
5.1 Aineisto

Vertailussa käytettiin genetiikan laboratoriossa aiemmin tutkittuja kasvainnäytteitä pohjukaissuolesta, suunielusta, mahalaukusta ja kaulan imusolmukkeesta, joista oli saatavilla manuaalianalyysin tulos. Valtaosa genetiikan laboratorion kudoksenäytteiden FISH:sta liittyy lymfoomadiagnostiikkaan, ja vertailussa käytetyt koettimet ovat tärkeitä lymfoomien diagnostiikassa, hoidossa ja ennusteen laatimisessa. Lymfoomadiagnostiikka perustuu World Health Organizationin (WHO) määrittelemiin kriteereihin, jotka toimivat kansainvälisenä vertailukohteena ja ohjaajana diagnostiikassa, hoidossa ja ennusteen määrittämisessä. Kriteerit eritellään välttämättömiin ja suositeltaviin, välttämättömien kriteerien on täyttyttävä jotta diagnoosia voidaan pitää luotettavana, suositeltavien kriteerien täyttymisellä saadaan lisätietoa ja tarkennusta diagnoosin tueksi. (Alaggio & Amador & Anagnostopoulos 2022.) Lymfoomanäytteiden analysoinnissa käytettävät koettimet valitaan WHO:n luokitusten ja tutkittavien geenialueiden mukaan, vertailunäytteiden analysoinnissa käytetyt koettimet ja niiden indikaatiot kuvataan taulukossa 1.

Taulukko 1. Vertailussa käytetyt koettimet ja niiden osoittamat geneettiset muutokset lymfoomadiagnostiikassa. (MetaSystems Probes, muokattu)

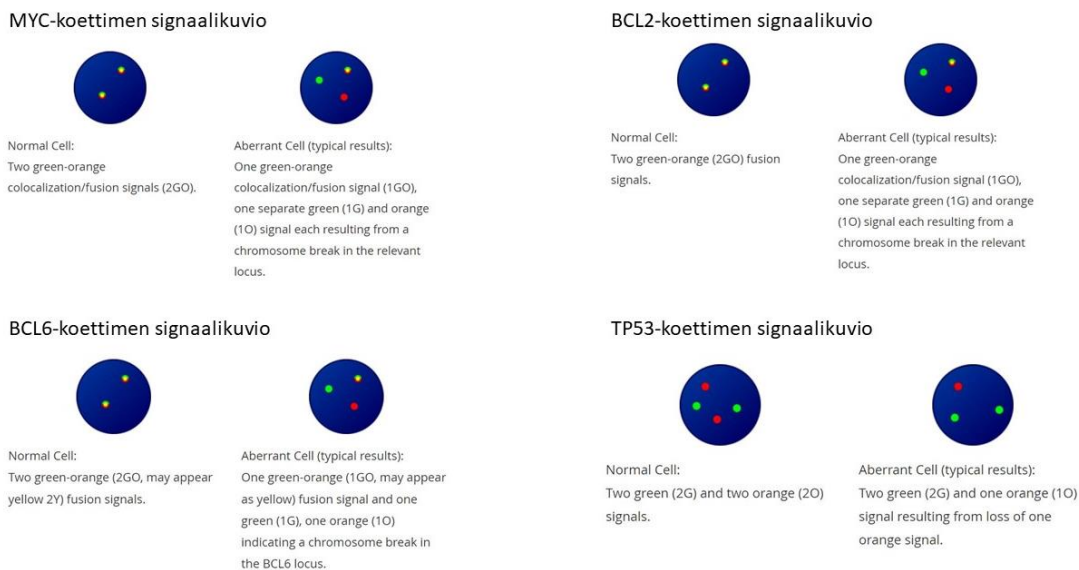
Koetin	Indikaatio
MYC	Translokaatio, jossa kromosomissa 8 sijaitseva geeni siirtyy yleisimmin kromosomiin 14. Koettimella voidaan havaita 8. kromosomin translokaatio kromosomeihin 2, 14 sekä 22.
BCL2	Kromosomissa 18 sijaitsevan <i>BCL2</i> -geenialueen katkeaminen.
BCL6	Koetin havaitsee kromosomissa 3 sijaitsevan <i>BCL6</i> -geenialueen hajoamisen.
TP53	Deleetio, jossa solun kasvua, erilaistumista ja DNA:n korjauksia säätelevä geeni kromosomissa 17 puuttuu.

Geneetikot valitsivat vertailuun neljä potilasnäytettä, joille on jo aiemmin tehty FISH-analyysi manuaalisella menetelmällä. Valituista näytteistä leikattiin patologian laboratoriossa peräkkäisiä leikkeitä, joille tehtiin hematoksyliini-eosiinivärjäys ja FISH. HE-värjäys on kustannustehokkain valinta vertailunäytteille, värjäys on automatisoitu ja yleisimmin käytössä oleva perusvärjäys, jolloin ylimääräiset kustannukset värjäyksestä pystyttiin minimoimaan. Aineiston valinta ja käsittely kuvataan kuviossa 4.



Kuvio 4. Aineiston valinta ja käsittely

Optimoinnilla pyritään saavuttamaan mahdollisimman parhaat tulokset ja laatu, ennen analysoinnin aloittamista on säädettävä skannerin asetuksia niin että saadaan mahdollisimman laadukkaita tuloksia. Skannerin laitevalmistaja vastaa optimoinnista, laboratorion henkilöstö toimittaa laitevalmistajalle tiedot käytetyistä koettimista ja niiden signaalikuviosta. Optimointi on koetinkohtainen, jokaista koetinta varten täytyy suorittaa optimointi ennen käyttöönottoa, optimointinäytteissä on oltava signaaleja jotta ne voidaan tunnistaa. Optimointiin valittiin suurisoluisen lymfooman diagnostiikassa käytettävät koettimet, jotka tunnistavat muutoksia *MYC*-, *BCL2*-, *BCL6*- ja *TP53*-geenialueilla. Koettimien muodostamat signaalit näyttäytyvät normaaleissa ja poikkeavissa soluissa eri tavoin, riippuen niiden sijainnista tai puuttumisesta kromosomeissa. Koettimilla *MYC*, *BCL2* ja *BCL6* tutkitaan geenien mahdollista translokaatiota, jolloin fuusiosignaali tarkoittaa että translokaatiota ei ole tapahtunut. *TP53*-koettimella tutkitaan fluoresoivien signaalien määrää, kasvunrajoitegeenin mahdollisessa deleetiossa nähdään oranssin signaalin alimäärää. Kuvassa 1 esitetään vertailussa käytettyjen koettimien signaalikuvat normaaleissa ja poikkeavissa soluissa.



Kuva 1. MYC-koettimen signaalikuviot normaalissa (vas.) solussa: kaksi fuusiosignaalia (2GO), poikkeavassa (oik.) solussa: tyypillinen muutos yksi fuusiosignaali (1GO) ja yksi vihreä (1G) sekä yksi oranssi (1O) signaali. BCL2-koettimen signaalikuviot normaalissa (vas.) solussa: kaksi fuusiosignaalia (2GO), poikkeavassa (oik.) solussa: tyypillinen muutos yksi fuusiosignaali (1GO) ja yksi vihreä (1G) sekä yksi oranssi (1O) signaali. BCL6-koettimen signaalikuviot normaalissa (vas.) solussa: kaksi fuusiosignaalia (2GO) jotka voivat näyttää keltaisilta (2Y), poikkeavassa (oik.) solussa: tyypillinen muutos yksi fuusiosignaali (1GO) ja yksi oranssi (1O) sekä yksi vihreä (1G) signaali. TP53-koettimen signaalikuviot normaalissa (vas.) solussa: kaksi vihreää (2G) ja kaksi oranssia (2O) signaalia, poikkeavassa (oik.) solussa: tyypillinen muutos kaksi vihreää (2G) ja yksi oranssi (1O) signaali. (MetaSystems Probes, muokattu.)

MYC-koettimella tunnistetaan kromosomissa 8 tapahtuva translokaatio *MYC*-esityöpa-geenialueella 8q24.21. Vihreällä ja oranssilla fluoresenssileimalla merkatut koettimet hybridisoidaan rinnakkain tutkittavalle geenialueelle, jolloin normaalissa solussa nähdään kaksi fuusiosignaalia ja poikkeavassa solussa nähdään tyypillisesti yksi fuusiosignaali, yksi vihreä ja yksi oranssi signaali, mikä viittaa *MYC*-geenin translokaatioon. MYC-koetinta käytetään tutkittaessa diffuusio suurisoluisista B-solulymfoomaa, follikulaarisista lymfoomia sekä manttelisolulymfoomaa ja muita lymfoomia. (MetaSystems Probes 2023 c.)

BCL2 on koetin, jolla tunnistetaan kromosomissa 18 sijaitsevan *BCL2*-geenialueen hajoaminen (break-apart) apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa säätelevällä alueella. Koettimet hybridisoidaan kromosomin 18q21.3-alueelle, oranssi koetin *BCL2*-geenialueen ylävirtaan ja vihreä alueen alavirtaan. Normaalissa solussa nähdään signaalikuvioina kaksi fuusiosignaalia, poikkeavassa solussa tyypillisesti yksi fuusiosignaali, yksi oranssi ja yksi vihreä signaali viitaten translokaatioon. *BCL2*-geenin uudelleenjärjestäytymistä esiintyy 50 % follikulaarisessa lymfoomassa, 23 % B-solulymfoomassa ja 15 %

diffuusissa suurisoluisessa B-solulymfoomassa. Uudelleenjärjestäytymisen seurauksena käynnistyy apoptoosia estävän BCL2-proteiinin ylituotanto, jolloin solun apoptoosi estyy. (MetaSystems Probes 2023 a.)

BCL6-koetin on break apart-koetin, jolla tunnistetaan geenin hajoaminen kromosomin 3 alueella 3q27-28. Vihreällä fluoresenssileimalla merkattu koetin hybridisoidaan tutkittavan alueen ylävirtaan, oranssilla fluoresenssileimalla merkattu koetin hybridisoidaan tutkittavan alueen alavirtaan. Normaalisissa solussa nähdään kaksi fuusiosignaalia ja poikkeavassa solussa tyypillisesti yksi fuusio-, yksi oranssi ja yksi vihreä signaali viitaten translokaatioon. Koetinta käytetään tutkittaessa follikulaarista lymfoomaa ja diffuusia suurisoluista B-solulymfoomaa. (MetaSystems Probes 2023 b.) Hajoamisen ja translokaation vaikutuksesta solun transkriptiotekijä häiriintyy, ja solun jakautuminen sekä DNA:n vaurioiden korjaaminen ei toimi normaalisti. Muutos edistää B-solulymfooman syntyä. (Green & Yang 2019.)

Kasvunrajoitegeeni *P53* säätelee solun erilaistumista, kasvua, kuolemaa ja DNA:n korjausta. Jos *P53*-geeni ei pysty toimimaan tai puuttuu, voivat vaurioituneet solut jatkaa kasvua ja lisääntymistä. *P53*-geenin toiminta on estynyt usein syöpäsoluissa. (Lehto & Pohjanen 2022.) TP53-koettimella tunnistetaan kromosomista 17 geeni *P53*. Jos potilaalla on jonkin toisen syöpämuutoksen lisäksi myös *P53*-deleetio, vaikutus ennusteseen on negatiivinen ja sairauden uusiutumisen riski kasvaa. Oranssi koetin hybridisoidaan kromosomin alueelle 17p13, jossa *P53*-geeni sijaitsee, ja vihreä koetin kromosomin sentromeeriin eli keskiosaan, joka toimii kontrollialueena. Normaalisissa solussa nähdään signaalikuviona kaksi oranssia ja kaksi vihreää signaalia, poikkeavassa solussa tyypillisesti kaksi vihreää ja yksi oranssi signaali. (MetaSystems Probes 2023 d.)

5.2 Näytteiden esikäsittely ja FISH

Opinnäytetyön toteutus aloitettiin vertailunäytteiden FISH-prosessilla. Näytteistä poistettiin parafiini Abbott VP2000-laitteella, poisto-ohjelmassa näytteitä käsitellään sitruunahapolla, ksyleenillä, vetykloridilla, formaliinilla, etanolilla sekä vedellä. Ohjelma suoritetaan kahdessa osassa, ensimmäisessä osassa parafiini liuotetaan kudoksista, ja valmistellaan kudoksen rakenteita hybridisaatiota varten. Ensimmäisen osan jälkeen näytteille tehdään pepsiinikäsittely manuaalisesti. Pepsiiniä pipetoidaan näytelaseille niin että leikkeet peittyvät, ja näytteitä inkuboidaan lämpökaapissa 37°C vähintään tunnin ajan. Pepsiinikäsittelyn jälkeen suoritetaan VP2000-laitteella parafiininpoisto-ohjelman

loppu, jossa näytettä käsitellään formaliinilla, etanolilla ja vedellä. Formaliini auttaa säilyttämään kudoksen rakenteen, vedellä huuhdotaan formaliini näytteistä ja etanolilla kuivatetaan näytteet.

Koettimet ja kudoksen tarkastelua helpottava DAPI-merkkiaine pipetoitiin näytelaseille. DAPI on kaupallinen liuos, joka auttaa säilyttämään fluoresenssia ja värjää solun rakenteita fluoresoivalla sinisellä. (Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH.) Peitinlasit liimattiin näytteiden kuivumisen estämiseksi. Hybridisaatio suoritettiin ThermoBrite-laitteella, joka nostaa lämpötilan ensin 90°C, jolloin näytteiden sekä koettimien DNA:t denaturoituvat. Denaturaatiovaihe kestää kaksi minuuttia, jonka jälkeen laite laskee lämpötilan 37°C ja hybridisaatio näytteiden ja koettimien välillä käynnistyy. Laite säilyttää 37°C lämpötilan, kunnes ohjelma sammutetaan ja näytteet poistetaan laitteesta, genetiikan laboratorion käytäntönä on hybridisoida näytteitä yön yli.

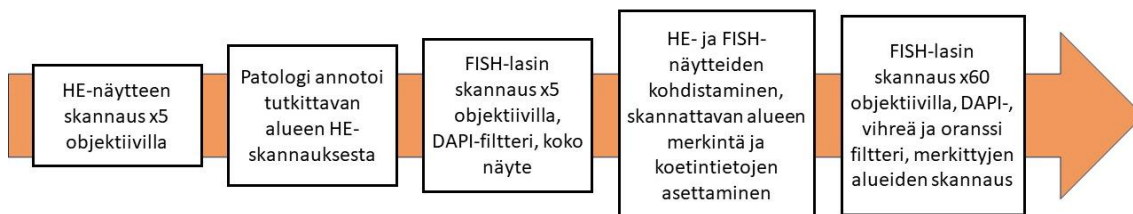
5.3 Näytteiden skannaus

Vertailunäytteet skannattiin fluoresenssimikroskoopilla, johon on liitetty kamera. Kuvassa 2 esitetty mikroskooppi ja työasema ovat vastaavat kuin opinnäytetyössä käytetyt, lisäksi työpisteeseen kuuluu fluoresenssilamppu ja sen virtalähde.



Kuva 2. Vasemmanpuoleisena fluoresenssimikroskooppi, johon on liitetty kamera ja kahdeksanpaikkainen skannaustaso. Oikealla näyttöpäite, mikroskoopin käyttö- ja ohjauspaneelit sekä tietokoneen näppäimistö. (Bioview.com, muokattu)

Skannauksen järjestys (kuvio 5) määräytyy prosessin vaiheiden mukaan, ensin skannataan HE-näyte jotta patologit voivat suorittaa annotoinnin, sitten skannataan FISH-näytteet kokonaan kudisleikkeiden kohdistamista varten. Leikkeiden ja annotoidun alueen kohdistamisen jälkeen merkataan skannausohjelmassa analysoitavat kohdat. Lopuksi skannataan FISH-näytteestä halutut kohdat analyysia varten.



Kuvio 5. Skannausjärjestys automaattisessa FISH-analyysissa.

Skannauksessa käytetään Bioview Duet-ohjelmaa, johon syötetään skannattavan näytteen tunnistetiedot ja halutut skannausasetukset. Ohjelma suorittaa skannauksen automaattisesti. Suunnitelmana oli lähettää kaikkien vertailunäytteiden HE-skannaukset patologille annotoitavaksi, mutta Bioview Solo-ohjelman annotaatiotyökalu ei ollut käytävissä. Laitevalmistajan selvittäessä ongelmaa päätettiin suorittaa analyysi patologin aiemmin merkkamien HE-leikkeiden perusteella. Näytteistä 1 ja 4 oli saatavilla aiemmin annotoidut HE-kuvat, näytteistä 2 ja 3 analysoitiin koko leike. FISH-lasien skannauksessa varmistettiin että näytteet skannattiin oikeiden tunnistetietojen alle, tietojen manuaalisessa syöttämisessä on aina virheiden mahdollisuus. Koko lasien skannauksessa käytettiin DAPI-filtteriä, jonka avulla pystyttiin havaitsemaan kudisleikkeen rakenne ja kohdat, joissa fluoresenssia oli runsaasti.

Koko lasien skannauksen jälkeen aloitettiin näytteiden kohdistaminen, annotoidun alueen havainnointi ja halutun analyysialueen merkkkaus. Kokonaan skannatulle FISH-näytteelle aloitettiin uusi skannaus, jota varten syötettiin uudet asetukset. Skannaustietojen syöttämisen jälkeen kohdistettiin näytteet valitsemalla HE- ja FISH-näytteistä vastaavat kohdat ja merkkamalla ne skannausohjelman työkalulla. Kohdistuksen silmämääräinen tarkkuus on riittävä, analysoitavia alueita merkattaessa tarkastellaan näytettä tarkemmin. Näytteiden kohdistamisen jälkeen merkattiin haluttu analyysialue näytteiden 1 ja 4 annotaation mukaan, näytteiden 2 ja 3 kohdalla valittiin edustavia alueita koko leikkeen alueelta. Kohdistettaessa annotoituja leikkeitä huomattiin kudosten erilaisuus, vertailunäytteiden leikkeiden rakenteet poikkesivat huomattavasti diagnoosivaiheessa saatujen HE-leikkeiden rakenteesta. Patologin annotoimat leikkeet oli leikattu

aiemmin, ja tämän jälkeen kudoksista tehty useita leikkeitä muita värjäyksiä ja analyyssejä varten. Näytteiden 1 ja 4 skannattavat ja analysoitavat alueet valittiin mahdollisimman yhdenmukaisesti annotoinnin mukaan, tuloksia tarkastellessa otettiin huomioon kudosten poikkeavuus diagnoosivaiheen näytteisiin verrattuna.

Koska diagnoosivaiheen näytteiden ja verifiointia varten tehtyjen kudoksetleikkeiden leikkaamisen välillä oli kulunut pitkä aika, oli mahdollista että näytteistä on välissä leikattu useita leikkeitä, eikä syöpäkudosta ollut enää jäljellä alun perin merkatulla alueella. Leikkeiden erilaisuuden ja materiaalin poisleikkautumisen vuoksi päätettiin suorittaa vertailunäytteille myös manuaalinen mikroskooppianalyysi. Manuaalisella mikroskopoinnilla haluttiin varmistaa analyysiohjelman tuloksien oikeellisuus sekä vahvistaa arviot kasvainsolujen poisleikkautumisesta. Manuaalisesta varmistusmikroskopoinnista saadaan tuloksia vasta opinnäytetyön valmistumisen jälkeen, joten tuloksia ei käsitellä opinnäytetyössä. Tulosten perusteella genetiikan laboratorio arvioi automaattisten ja manuaalisten analyysien tulosten vertailukelpoisuutta, ja sovittaa tulokset opinnäytetyön vertailutuloksiin.

Fluoresenssi on vahvempi alueilla, joissa signaaleja esiintyy, joten analyysiin valittiin kohdat, joissa fluoresenssi oli vahvaa. Näytteen laatua huomioitiin ja valittiin analyysiin kohtia, joissa solut olivat mahdollisimman irrallaan ja selkeitä. Analysoitavan alueen valinnan jälkeen skannattiin valitut kohdat analyysia varten. Skannauksessa käytettiin 60-kertaista objektiivia ja vihreää, oranssia sekä DAPI-filtteriä. Skannauksen päätyttyä näyte oli valmis analysoitavaksi.

5.4 Signaalien tarkastelu analyysiohjelmalla

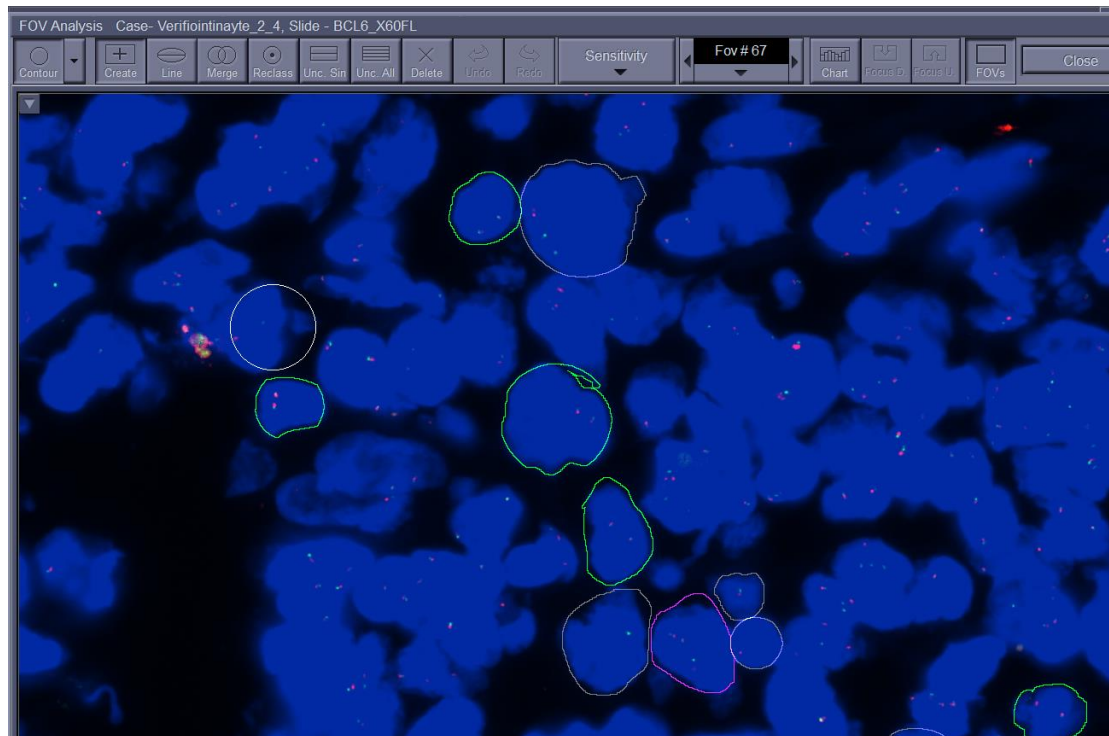
Genetiikan laboratorion käytäntönä on analysoida sytologisista FISH:sta 200 solua ja histologisista 100 solua. Toisinaan ehjien ja analyysikelpoisten solujen löytäminen on haasteellista johtuen näytteen laadusta. FISH:n voi tällöin uusida ja analysoida mahdollisimman paljon analyysikelpoisia soluja. Mikäli uusintanäytteen laatu ei parane, keskustellaan tulosten luotettavuudesta geneetikkojen kanssa. Histologisten näytteiden automatisoidussa analyysissä käytetään Bioview Solo-ohjelmaa, jonka työkalujen avulla valitaan skannatuista alueista analyysikelpoiset solut. Koettimen tietojen perusteella ohjelma tunnistaa ja luokittelee normaalit sekä poikkeavat solut. Signaaliluokat ja niiden selitteet kuvataan taulukossa 2. Ohjelma laskee analysoiduista soluista normaali- ja poikkeavien solujen suhteen ja esittää tulokset prosentteina, kappalemäärinä sekä ympyräkaaviona.

Taulukko 2. Vertailussa käytettyjen koettimien signaalikuvioiden lajittelu. G=vihreä, O=oranssi, F=fuusio, Y=keltainen. (MetaSystems Probes, muokattu)

Koetin	Signaali	Luokittelu
MYC	2F	Normaali
	1F, 1G, 1O	Poikkeava
	3F	Poikkeava
BCL2	2F	Normaali
	1F, 1G, 1O	Poikkeava
	3F	Poikkeava
BCL6	2F	Normaali
	1F, 1G, 1O	Poikkeava
	3F	Poikkeava
TP53	2F	Normaali
	2G, 1O	Poikkeava

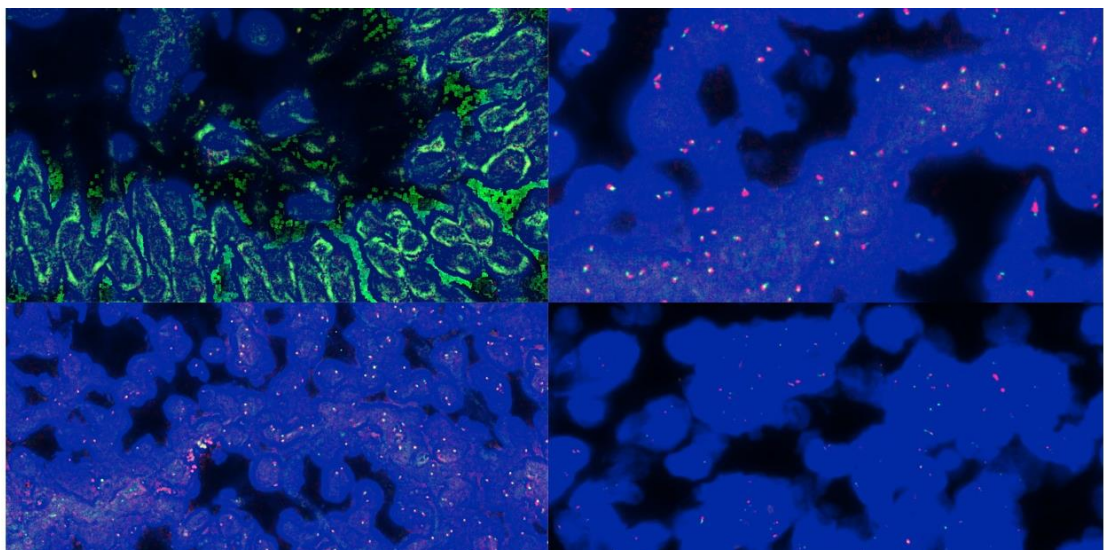
Analyysiohjelman algoritmit eivät pysty tunnistamaan ja luokittelemaan kaikkia signaalikuvioita, johtuen signaalien laadusta, ylimääräisestä fluoresenssista ja solujen epäselvästä rakenteesta. Analysoijan tehtävänä on luokitella ohjelman ohittamat solut, ja varmistaa ohjelman automaattisen luokittelun oikeellisuus. Lajiteltaessa soluja signaalien perusteella kiinnitettiin huomiota solujen ja kudoksen rakenteeseen ja signaalien vahvuuteen ja selkeyteen. Hajonneet solut, ja solut, jotka olivat kasassa tai päällekkäin ja haasteellisia erottaa, jätettiin analyysin ulkopuolelle.

Analyysi aloitettiin käymällä läpi skannatut alueet, ja arvioimalla niiden analyysikelpoisuus. Alueet käytiin yksitellen läpi, ja ohjelman työkaluilla valittiin analyysikelpoiset solut ja säädettiin signaalien voimakkuutta, esimerkiksi Create-työkalulla valittiin analysoitavat solut ja Sensitivity-työkalulla säädettiin signaalien voimakkuutta (kuva 3).



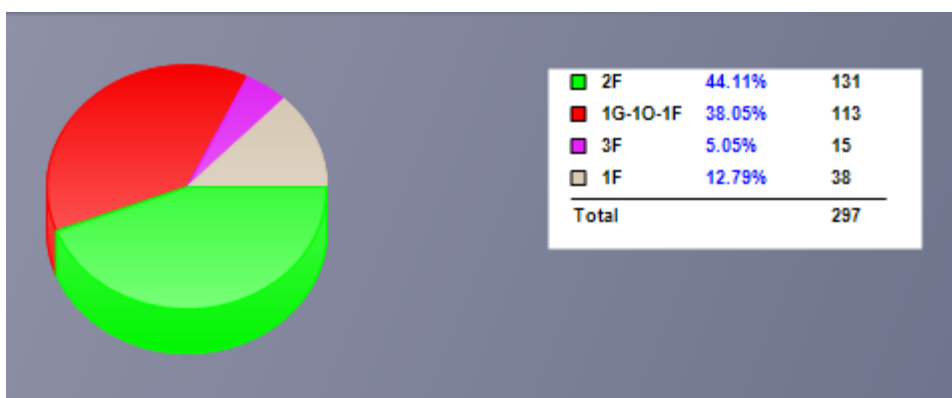
Kuva 3. Analyysiohjelman solujen valintänäkymä. Kuvassa vihreällä renkaalla ympäröidyt solut ohjelma on luokitellut normaaleiksi (2F), violetilla poikkeavaksi (3F) ja valkoisella on ympäröity solut, joita ohjelma ei ole pystynyt luokittelemaan.

Kudosleikkeiden rakenteen ja ylimääräisen fluoresenssin vuoksi joitain skannattuja alueita, tai yksittäisiä soluja ei voitu analysoida, solujen päällekkäisyyden, ylimääräisen taustan tai signaalien puuttumisen vuoksi. (kuva 4). Tiiviissä kudoksissa yksittäisten solujen analyysin ollessa mahdotonta, voidaan kuitenkin yleisnäköisestä tarkastella signaaleja ja havaita mahdolliset translokaatiot ja deleetiot, sekä arvioida poikkeamien osuutta normaaleista soluista.



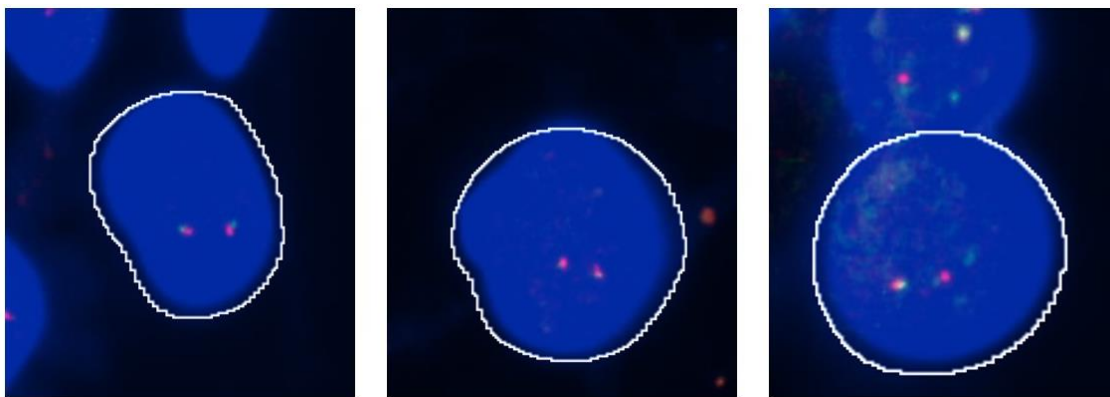
Kuva 4. Haasteellisia skannausnäkyviä. Vasen ylänurkka: duodenum, mahdolliset signaalit jäävät ylimääräisen fluoresenssin alle, analyysikelvoton näkymä. Oikea ylänurkka: kaulan imusolmuke, solujen yksittäinen analyysi ei onnistu niiden päällekkäisyyden ja tiheyden vuoksi. Vasen alanurkka: kaulan imusolmuke, solujen yksittäinen analyysi ei onnistu niiden päällekkäisyyden ja tiheyden vuoksi, taustafluoresenssi ei häiritse analyysia. Oikea alanurkka: suunielun tuumori, solujen yksittäinen analyysi ei onnistu niiden päällekkäisyyden ja tiheyden vuoksi.

Analysoitavien solujen valinnan jälkeen tarkasteltiin yksittäisiä soluja, varmistettiin ohjelman automaattisten luokitusten oikeellisuus ja luokiteltiin ohjelman luokittelemattomat solut manuaalisesti. Valmiiden luokkien lisäksi ohjelmassa voitiin lisätä erilaisia luokkia havaittujen signaalien mukaan. Analyysin tulokset esitettiin suhdelukuina, kappalemäärinä sekä ympyräkaaviona (kuva 5).

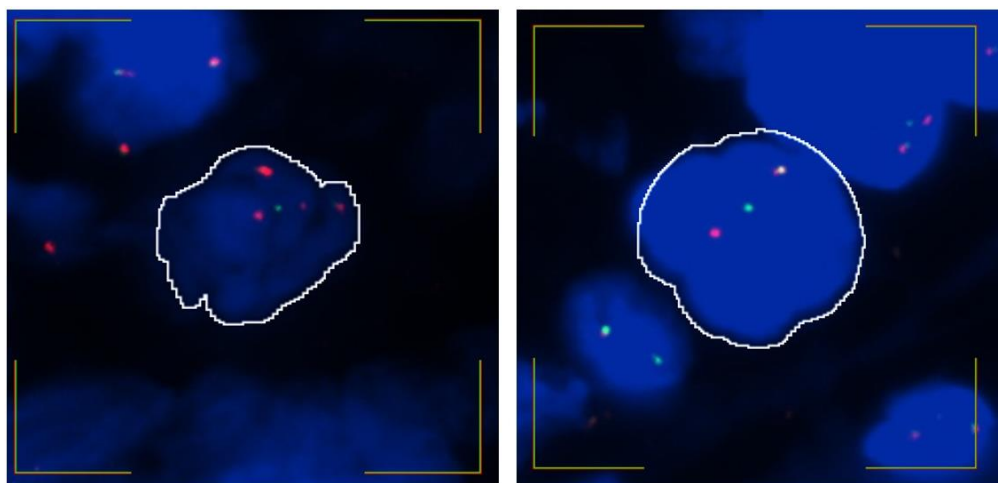


Kuva 5. Esimerkki analyysiohjelman ympyräkaaviosta, näyte 2, koetin BCL6. Näyte on poikkeava, translokaatio 1G-1O-1F 38 % analysoiduista soluista. Taulukon vasen sarake kertoo kaavioon sisällytetyt signaaliluokat ja niiden värin ympyräkaaviossa, keskimäinen sarake signaalien osuuden solujen kokonaismäärästä prosentteina, ja oikea sarake solujen kappalemäärän, jossa kyseistä signaalikuviota esiintyy. Alin rivi kertoo analysoidujen solujen kokonaismäärän, tässä 297 solua. Kaavio koostuu enintään kuudesta luokituksesta, selkeyden vuoksi vertailun kaavioista jätettiin pois luokat, joiden pienen koon perusteella niillä ei ole diagnostista merkitystä.

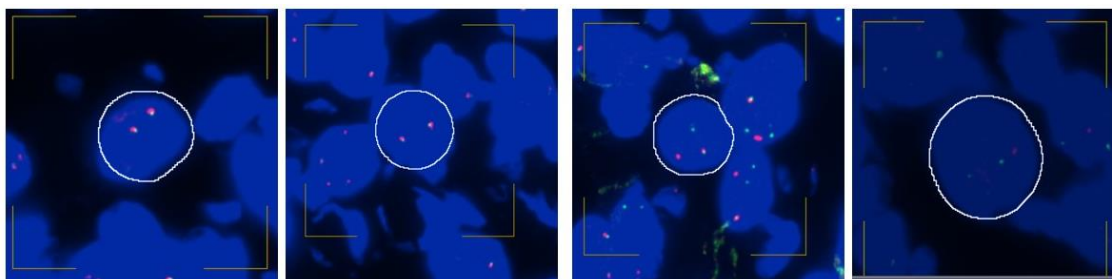
Potilasnäytteiden analyysistä laaditaan raportti, johon lisätään ympyräkaavio ja edustavia kuvia näytteestä, soluista, ja signaaleista. Vertailunäytteistä raportin laatiminen ei ollut tarpeellista, analyysien tulokset jäävät ohjelmaan talteen, josta niitä voi tarkastella myöhemmin. Analyysin aikana poimittiin näytteistä kuvia, jotka edustavat normaaleja soluja ja tyypillisiä poikkeamia (kuvat 6–9).



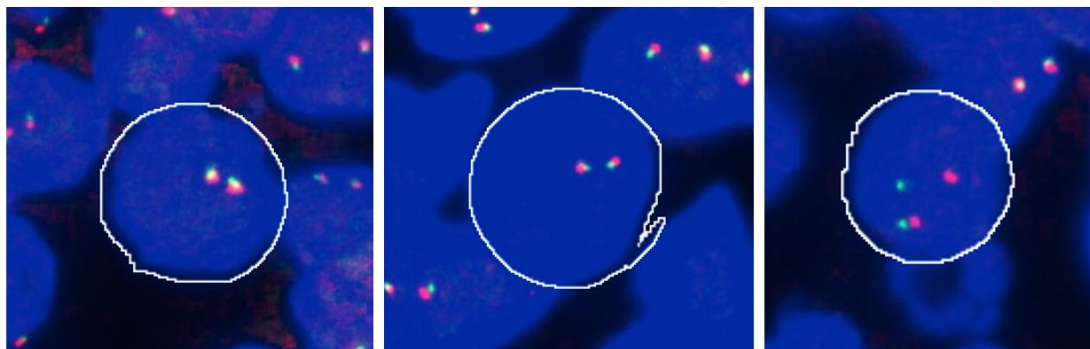
Kuva 6. Näyte 1, yksittäisiä soluja. Vasemmalla BCL2-koetin ja normaali solu, jossa kaksi fuusiosignaalia. Keskellä MYC-koetin ja normaali solu, jossa kaksi fuusiota. Oikealla MYC-koetin ja poikkeava solu, jossa translokaatio: yksi fuusio, yksi oranssi ja yksi vihreä signaali.



Kuva 7. Näyte 2, yksittäisiä soluja. Vasemmalla BCL2-koetin ja poikkeava solu, jossa translokaatio: yksi fuusio, yksi oranssi ja yksi vihreä signaali. Oikealla BCL6-koetin ja translokaatio: yksi fuusio, yksi oranssi ja yksi vihreä signaali.



Kuva 8. Näyte 3, yksittäisiä soluja. Ensimmäisenä vasemmalta BCL2-koetin ja normaali solu, jossa kaksi fuusiosignaalia. Toisena vasemmalta BCL6-koetin ja normaali solu, jossa kaksi fuusiosignaalia. Kolmantena vasemmalta MYC-koetin ja poikkeava solu, jossa translokaatio: yksi fuusio, yksi oranssi ja yksi vihreä signaali. Neljäntenä vasemmalta TP53-koetin ja poikkeava solu, jossa deleetio: kaksi vihreää ja yksi oranssi signaali.



Kuva 9. Näyte 4, yksittäisiä soluja. Vasemmalla BCL6-koetin ja normaali solu, jossa kaksi fuusiosignaalia. Keskellä MYC-koetin ja normaali solu, jossa kaksi fuusiosignaalia. Oikealla BCL2-koetin ja poikkeava solu, jossa translokaatio: yks fuusio, yksi oranssi ja yksi vihreä signaali.

Analyysi tehtiin yhteensä neljälle kudokselle, joista jokaisella neljä eri koetinta, analysoitujen näytteiden määrä yhteensä 16 kappaletta. Kahdesta näytteestä skannattiin koko kudokset, kahdesta patologin merkkäama alue. Kuudestatoista näytteestä analyysi pystyttiin tekemään 13 näytteelle (81 %), kolmessa näytteessä ei havaittu signaaleja annotoidulla alueella. Signaaleja luokiteltaessa vähäisen solumäärän sisältävät luokat sisällytettiin unclassified-luokkaan tulosten selkeyttämiseksi. Hyvälaatuisissa näytteissä pystyttiin analysoimaan vaivattomasti useita satoja soluja, haasteellisissa näytteissä alhaisimmillaan alle 10 solua. Vertailutaulukossa (liite 1) kuvataan tarkemmin analysoitujen solujen määrä kussakin näytteessä.

6 Tulokset

Vertailun parametrina käytettiin signaalien suhdelukuja ja signaalikuvioita. Manuaalisen ja automaattisen analyysin vertailussa tarkasteltiin, vastasivatko analyysien signaalikuviot ja tulokset toisiaan, tuloksia arvioitiin pos/neg-tasolla. Solujen tunnistuksessa havainnoitiin analyysimenetelmien välisiä eroja tunnistettujen solujen määrästä ja tunnistuksen sujuvuudesta. Näytteiden laatua ja signaalien selkeyttä havainnoitiin ja arvioitiin silmämääräisesti. Tilastollisilla menetelmillä tehty vertailu ja analyysi ei vähäisen näyttemäärän vuoksi olisi tuottanut merkittävää hyötyä.

6.1 Manuaalisen analyysin tulokset

Kaikille kudoksille on aiemmin tehty manuaalinen FISH-analyysi, joiden lausunnoista oli käytettävissä anonymisoidut tiedot havaituista signaaleista, näytteen laadusta, analysoitujen solujen määrästä sekä analyysin tuloksista.

Näytteen 1 analyysin tulos oli poikkeava, analysoiduista noin 100 solusta valtaosassa (n. 90 %) *MYC*-translokaatio. *BCL2*-, *BCL6*- sekä *TP53*-koettimien osalta analyysin tulos oli negatiivinen.

Näytteen 2 analyysissä todettiin myös poikkeamia. Analysoiduissa noin 100 solusta valtaosassa todettiin *BCL6*-translokaatio. *MYC*- ja *BCL2*-translokaatioita ei todettu, mutta molempien koettimien kohdalla havaittiin tutkittavien signaalien ylimäärää. *MYC*-koettimella analysoiduissa soluissa valtaosassa 3 fuusiota, *BCL2*-koettimella analysoidessa noin 40–50 % 3 fuusiota. *TP53*-koettimella analysoidessa tulos oli epäselvä koettimen ja näytteen laadun vuoksi.

Näytteen 3 analyysin tulos oli poikkeava, yli 90 % analysoiduista soluista todettiin *MYC*-translokaatio, ja 56 % todettiin *TP53*-deleetio. Analysoija huomautti, että leike oli todella tiheä ja tuhruinen, joka vaikeutti analyysia. *MYC*-koettimella analysoitiin noin 100 solua, *TP53*-koettimella noin 70 solua. *BCL2*- ja *BCL6*-translokaatioiden osalta näyte oli negatiivinen.

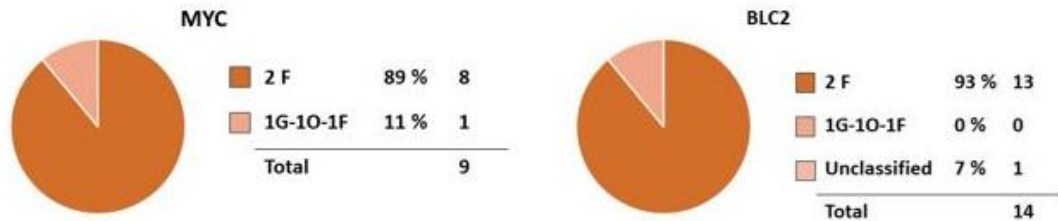
Näytteen 4 analyysissä todettiin poikkeamia. Patologin merkkäamalla alueella valtaosassa analysoituja soluja todettiin *BCL2*-translokaatio. Analysoija huomautti, että leike oli paksu, signaalit eri tasoissa ja vihreät signaalit heikkoja. *MYC*-, *BCL6*- ja *TP53*-koettimien osalta näyte oli negatiivinen.

6.2 Automaattisen analyysiohjelman tulokset

Analyysiohjelman algoritmit lajittelivat analysoidut solut signaalikuvioiden mukaisesti luokkiin, valtaosassa näytteitä lisättiin luokkia, joita ei automaattisesti ollut määriteltä, esimerkiksi yhden fuusion tai yhden vihreän ja yhden oranssin signaalin luokat. Luokkien lisäyksen avulla saatiin laskettua tarkat suhdeluvut ja saatiin parempi kokonaiskuva analyysin tuloksesta, vähäisen solumäärän sisältävät luokat jätettiin lopullisen tuloksen ulkopuolelle. Ohjelma ei pystynyt tunnistamaan valtaosaa soluista, jolloin analysoijan tehtävänä oli luokitella solut, joita ohjelma ei tunnistanut.

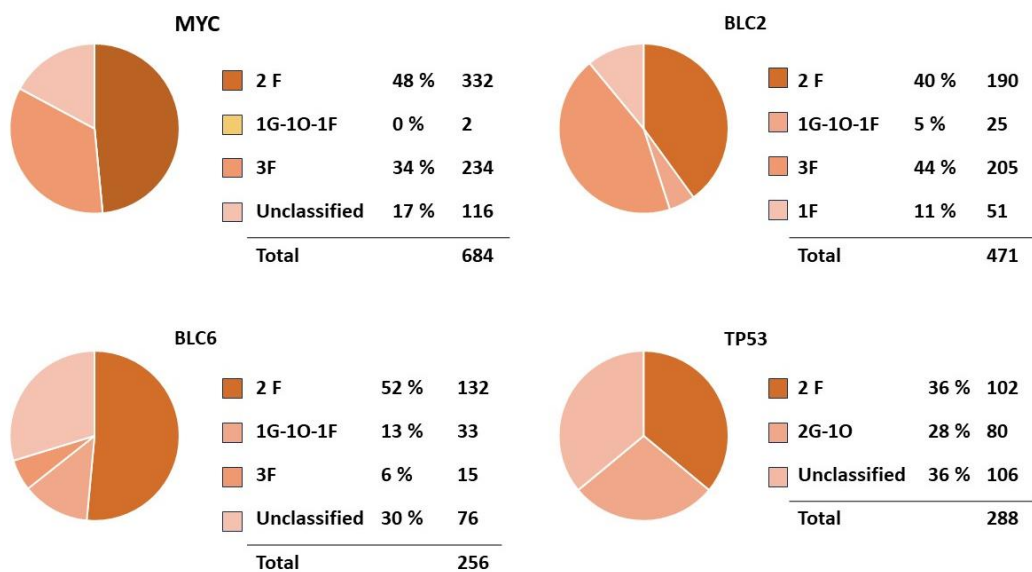
Näytteestä 1 analysoitiin solut patologin annotoimalta alueelta. Näyte ei ollut kovin laadukas, tiheä kudos ja runsas taustafluoresenssi häirtasivat analyysia. Analysoitujen solujen määrä jäi vähäiseksi. *MYC*-koetinta käytettäessä analysoitiin 9 solua, joissa havaittiin translokaatio kahdessa solussa. *BCL2*-koetinta käytettäessä analysoitiin 14 so-

lua, joissa ei havaittu translokaatioita. BCL6-, ja TP53-koettimilla hybridisoiduissa näytteissä ei havaittu signaaleja annotoidulla alueella. Kuvissa 10 esitetään analyysin tulokset ympyräkaavioina.



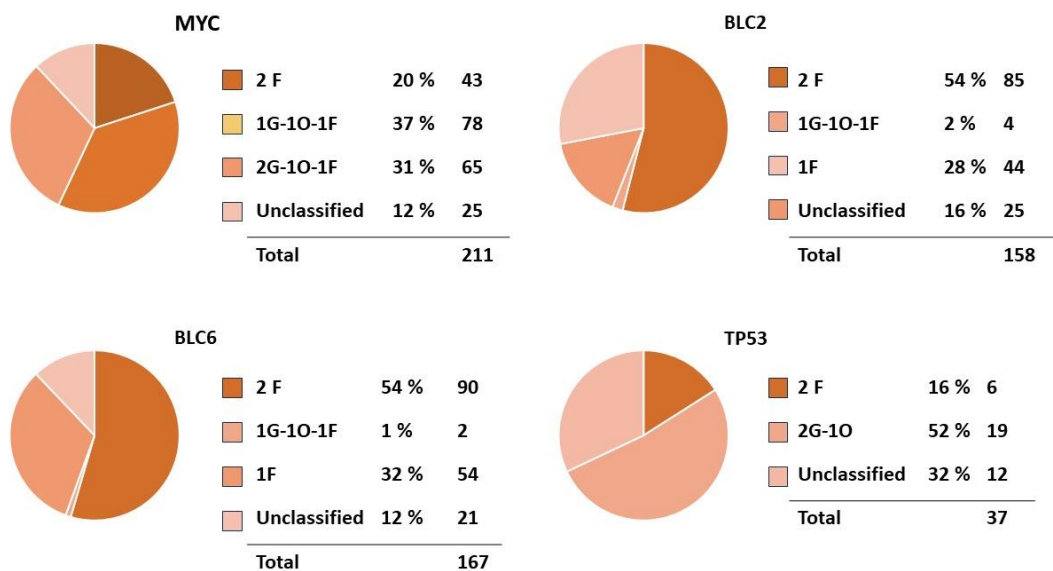
Kuva 10. Ympyräkaaviot näytteen 1 analyysin tuloksista. MYC-koettimella yhdeksästä solusta yhdessä havaittiin translokaatio, BCL-koettimella neljästätoista solusta ei havaittu translokaatiota.

Näyte 2 analysoitiin koko leikkeen alueelta, analyysiin valittiin soluja runsaan DAPI-fluoresenssin alueelta. Näyte oli laadukas, ja yksittäiset solut sekä signaalit erottuivat hyvin. MYC-koetinta käytettäessä analysoitiin 684 solua, joista ei todettu translokaatioita. Näytteessä havaittiin kuitenkin 34 % soluista *MYC*-ylimäärää eli kolmen fuusiosignaalin soluja. BCL2-koetinta käytettäessä analysoitiin 471 solua, joista ei todettu translokaatioita, 43 % analysoituja soluja havaittiin *BCL2*-ylimäärää eli kolmen fuusiosignaalin soluja. BCL6-koetinta käytettäessä analysoitiin 256 solua, joista 13 % analysoituja soluja todettiin translokaatio, ja 6 % kolme fuusiosignaalia. TP53-koetinta käytettäessä analysoitiin 288 solua, joista 28 % soluista todettiin deletio. Kuvassa 11 esitetään analyysin tulokset ympyräkaaviona.



Kuva 11. Ympyräkaaviot näytteen 2 analyysin tuloksista. MYC-koettimella 684 solusta havaittiin *MYC*-geenialueen ylimäärää, translokaatioita ei havaittu merkittäviä määriä. *BCL2*-koettimella 471 solusta havaittiin *BCL2*-geenialueen ylimäärää, translokaatioita ei havaittu merkittäviä määriä. *BCL6*-koettimella 256 solusta havaittiin translokaatio 13 % soluista, sekä jonkin verran *BCL6*-geenialueen ylimäärää. TP53-koettimella 288 solusta havaittiin deleetio 28 %, sekä signaalikuvioita luokittelemattomia soluja 36 %.

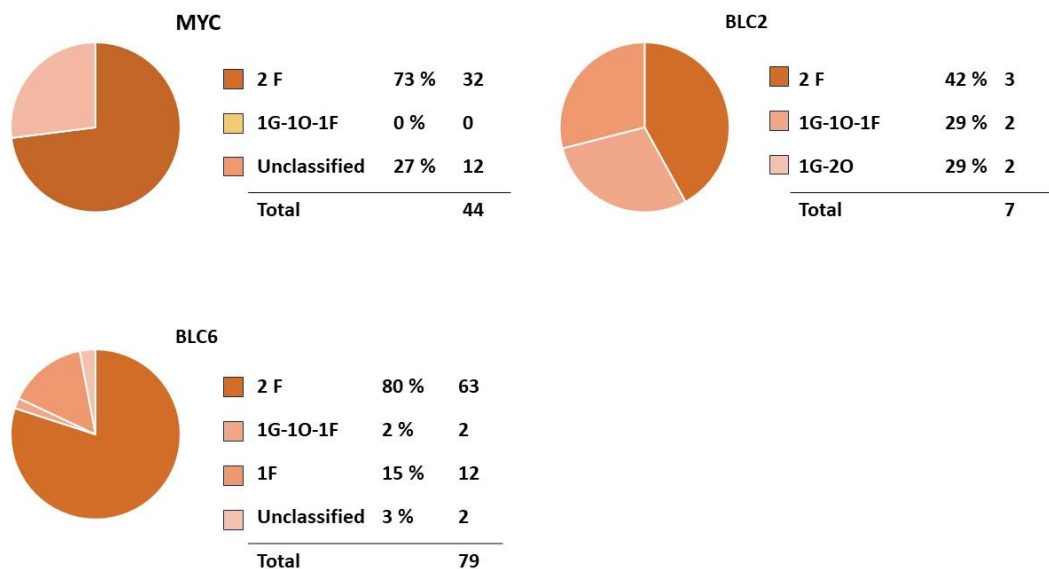
Näyte 3 analysoitiin koko leikkeen alueelta, analyysiin valittiin soluja runsaan DAPI-fluoresenssin alueelta. Näyte oli tiheä ja signaalit osalla koettimista paikoin heikkoja. *MYC*-koetinta käytettäessä analysoitiin 211 solua, joista 37 % todettiin translokaatio. *BCL2*-koetinta käytettäessä analysoitiin 158 solua, joista ei havaittu merkittävää määrää translokaatiota. *BCL6*-koetinta käytettäessä analysoitiin 167 solua, joista ei havaittu translokaatiota. TP53-koetinta käytettäessä analysoitiin 37 solua, joista todettiin deleetio 53 % soluista. *BCL2*- ja *BCL6*-koettimia käytettäessä havaittiin molemmissa näytteissä noin 40 % analysoiduista soluista yhden fuusion tai yhden oranssin ja yhden vihreän signaalin soluja. Kuvassa 12 esitetään analyysin tulokset ympyräkaavioina.



Kuva 12. Ympyräkaaviot näytteen 3 analyysin tuloksista. *MYC*-koettimella 211 solusta havaittiin translokaatio 37 % soluista ja translokaatioita, joissa vihreän signaalin ylimäärää havaittiin 31 % soluista. *BCL2*-koettimella 158 solusta ei havaittu translokaatioita merkittäviä määriä, yhden fuusiosignaalin soluja oli 28 %. *BCL6*-koettimella 167 solusta ei havaittu translokaatioita merkittäviä määriä, yhden fuusiosignaalin soluja oli 32 %. TP53-koettimella 37 solusta deleetio havaittiin 19 solussa.

Näyte 4 analysoitiin patologin annotoimalta alueelta. Näytteen kudus oli tiheää, ja fluoresenssi runsasta, yksittäisiä soluja oli haasteellista erottaa. *MYC*-koetinta käytettäessä analysoitiin 44 solua, joista ei todettu translokaatioita. *BCL2*-koetinta käytettäessä analysoitiin 7 solua, joista kahdessa todettiin translokaatio. *BCL6*-koetinta käytettäessä

analysoitiin 79 solua, joista ei havaittu translokaatioita. TP53-koettimella hybridisoidusta näytteestä ei havaittu signaaleja annotoidulla alueella. Kuvassa 13 esitetään analyysin tulokset ympyräkaavioina.



Kuva 13. Ympyräkaaviot näytteen 4 analyysin tuloksista. MYC-koettimella 44 solusta ei havaittu translokaatioita. BCL2-koettimella seitsemästä solusta havaittiin translokaatio kahdessa solussa. BCL6-koettimella 79 solusta ei havaittu translokaatioita merkittäviä määriä.

Näytteet, joissa ei havaittu signaaleja tarkastettiin manuaalisesti fluoresenssimikroskoopilla, ja varmistettiin signaalien puuttuminen. Analysoidessa tehtiin havaintoja kudoksen rakenteesta, hybridisaation onnistumisesta sekä signaalien vahvuudesta ja esiintymisestä skannatuilla alueilla. Näytteen ja FISH-prosessin laadulla voidaan vaikuttaa analyysin onnistumiseen ja luotettavuuteen, laatu on huomioitava tuloksia tarkastellessa.

6.3 Tulosten tarkastelu ja vertailu

Analyysien tulokset olivat yhdenmukaisia pos/neg-tasolla ja niiltä osin kun analyysin pystyi suorittamaan, tuloksia esitetään taulukossa 3. Analyysiohjelmalla saadut tulokset olivat tarkempia kuin manuaalisen analyysin, ja ohjelma laski automaattisesti analysoidujen solujen suhdeluvut. Näytteiden 1 ja 4 analyysissä annotoidulta alueelta analysoidujen solujen määrä oli huomattavasti vähäisempi kuin manuaalisessa analyysissä, tämä huomioitiin arvioitaessa ja vertailla tuloksia. Kaikkien näytteiden manuaalinen FISH-analyysi on tehty aiemmin leikatuista kudokseteistä, joten kasvainsolujen osuus

voi olla vertailunäytteissä vähäisempi, koska kudoksista on voitu leikata merkittävän paljon materiaalia analyysien välissä.

Taulukko 3. Vertailun tulokset pos/neg-tasolla, pos: näytteestä havaittiin diagnostinen poikkeama, neg: näytteestä ei havaittu diagnostista poikkeamaa. x3 tarkoitetaan tutkittavan geenialueen ylimäärää, valtaosa kolmen fuusiosignaalin soluja. ? tarkoitetaan automaattianalyyseissä näytteitä, joissa ei havaittu signaaleja tutkittavalla alueella, manuaalisessa analyysissä ? tarkoitetaan analyysin epäonnistumista näytteen laadun vuoksi.

	Manuaalinen analyysi				Bioview-analyysi			
	MYC	BCL2	BCL6	TP53	MYC	BCL2	BCL6	TP53
Näyte 1	pos	neg	neg	neg	pos	neg	?	?
Näyte 2	x3	x3	pos	?	x3	x3	pos	pos
Näyte 3	pos	neg	neg	pos	pos	neg	neg	pos
Näyte 4	neg	pos	neg	neg	neg	pos	neg	?

Vertailun perusteella voidaan todeta Bioview-skannauksen ja analyysin sopivan lymfoomakudosleikkeille. Skannauksessa ja analyysissä todettiin menetelmän toimivan hyvin laadukkailla näytteillä. Haasteellisemmatkin näytteet voidaan skannata automaattisesti, kaikkein haasteellisimpia ei kuitenkaan analyysiohjelmalla ole mahdollista analysoida. Kudoksen rakenteesta ja hybridisaation onnistumisesta riippuen analyysia on tehtävä myös manuaalisesti mikroskopoimalla, silloin kun näytteen laatu ei ole riittävä automaattianalyyseille. Automaatiolla ei voida täysin korvata ammattilaisen työskentelyä kudoksetleikkeen FISH-analyyseissä. Ajankäyttöä arvioidessa todettiin että Bioview-skannaukseen ja analyysiin kuluu useimmiten enemmän aikaa kuin manuaaliseen mikroskopointiin.

Skannausta ja analyysia suorittaessa havaitut haasteet ja ongelmat pyrittiin ratkaisemaan välittömästi, laitevalmistajalle ilmoitettiin sellaiset ongelmat, jotka olivat heidän korjattavissaan ja työntekijöitä tiedotettiin ongelmista, kehityskohteista ja ratkaisuista. Ratkaisuja pohdittiin yhdessä geneetikkojen ja FISH-analyysoijien kanssa. Haasteet ja ongelmat, mahdolliset syyt sekä ratkaisut kuvataan taulukossa 4. Aiempien tutkimustulosten perusteella voitiin varautua samankaltaisiin ongelmiin ja haasteisiin, ja pystyttiin vertailemaan kohdattuja ongelmia ja haasteita, sekä niiden ratkaisuja.

Taulukko 4. Haasteet, kehityskohteet ja ratkaisut.

Haasteet ja kehityskohteet	Selite	Ratkaisu
Tiheä kudosis	Kudoksen normaali rakenne on haasteellinen, kasvainsolukon rakenne on haasteellinen	Signaalien tarkastelu yleisnäkymästä, ei yksittäisistä soluista. Manuaalinen analyysi.
Runsas taustafluoresenssi	Parafiinijäämiä tai roskaa näytteessä. Hybridisaation jälkeisen pesun epäonnistuminen.	FISH:n uusinta, parafiinin poistohjelman säätö. Näytteen pesu, hybridisaation ja sen jälkeisen pesun uusinta.
Signaalien puuttuminen	Hybridisaation epäonnistuminen, koettimen ominaisuudet	Hybridisaation uusinta, koettimen vaihto haasteellista koska käytössä vain yhden valmistajan koetin
Analyysiohjelman työkalujen ongelmat	Ohjelman toiminnot ensimmäistä kertaa käytössä laboratorioissa	Laitevalmistajan tekemät korjaukset ja muutokset
Näytteen ominaisuuksista johtuva skannausten epäonnistuminen	Runsas taustafluoresenssi, hybridisaation epäonnistuminen	Uusi näyte, hybridisaation uusiminen, manuaalinen analyysi

Kudoksen normaalista rakenteesta tai kasvaimen rakenteesta johtuvaa tiheys vaati signaalien tarkastelun yleisnäkymästä, yksittäisiä soluja voitiin analysoida vain pieniä määriä. Runsaan taustafluoresenssin omaavat näytteet pyrittiin analysoimaan alueilta, joilla taustafluoresenssi oli vähäisintä, uusintahybridisaatiota ei tarvittu. Näytteet, joissa ei havaittu signaaleja jätettiin analysoimatta, uusintahybridisaatiolle ei koettu tarvetta koska käytetyllä koettimella saatiin usein heikkoja signaaleja. Analyysiohjelman työkalujen kanssa ilmenneet ongelmat tiedotettiin laitevalmistajalle, joka pyrkii löytämään ratkaisut ongelmiin. Näytteet, joilla skannaus epäonnistui, skannattiin uudelleen muokatuilla skannausasetuksilla.

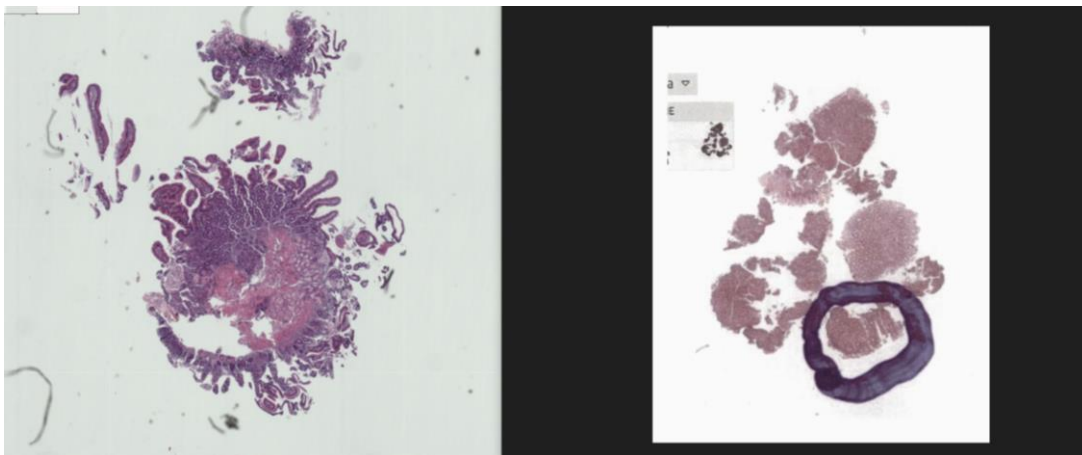
7 Pohdinta

Kudosleikkeen rakenne ja hybridisaation onnistuminen vaikuttavat tuloksiin samoin kuin manuaalisesti mikroskopoidessa, runsas tausta tai roskat näytteessä häiritsevät skannausta ja analyysia. Tiiviistä kudoksesta on haasteellista erottaa yksittäisiä soluja, jolloin laskennalliset tulokset ovat vain suuntaa antavia. Skannauksen todettiin sopivan

kudosleikkeille, joissa taustafluoresenssi oli matalaa eikä häirinnyt skannattavia kuvia. Tietotekniset ongelmat toivat omat haasteensa vertailuun, ongelmien ratkaisussa kului aikaa, ja potilasnäytteitä analysoidessa viivästykset vaikuttavat diagnoosiin ja hoitoon.

Analyysin ja vertailun tuloksia tarkastellessa havaittiin samanlaisia tuloksia ja huomioita kuin aiemmissa tutkimuksissa ja vertailuissa aiheesta, sekä joitain eroavaisuuksia. Bode ym. olivat vertailua tehdessään tyytyväisiä helppoon tiedon jakamiseen, kuvien skannaukseen ja etäyhteyksiin sekä tallennustilan paranemiseen. Etäyhteydet laitevalmistajan kanssa sekä tiedon jakaminen patologian ja genetiikan laboratorioden välillä toimivat sujuvasti opinnäytetyön kaikissa vaiheissa. Analyysiohjelman työpöytä- sekä verkkoversioissa huomattiin työn edetessä muokkausta vaativia ominaisuuksia, etäyhteyden avulla laitevalmistaja pääsi korjaamaan ongelmia välittömästi. Analyysiohjelmaa käytettäessä huomattiin kuten Clement ym. vertailussaan, että signaalien ja solujen tunnistus tarvitsi manuaalista korjausta, jonka jälkeen tulokset olivat yhdenmukaisia verrattaessa manuaaliseen analyysiin. Yhtäpitävä havainto tehtiin myös Hell ym. tutkimuksen kanssa näytteiden edustavuuden ja menetelmän standardisoinnin positiivisesta vaikutuksesta tuloksiin. Hell ym. totesivat tutkimuksessaan automatisoidun skannauksen nopeuttavan analyysia, tässä ei oltu yhtä mieltä arvioitaessa ja vertaillessa manuaaliseen ja automaattiseen menetelmään kuluvaa aikaa.

Kahdesta vertailunäytteestä oli käytössä patologin annotoitu alue, joka oli merkattu aiemmin tehdylle HE-kudosleikkeelle. Vertailua varten tehtyjen kudosleikkeiden rakenne poikkesi patologin merkkamien kudosleikkeiden rakenteesta (kuva 14). Leikkeiden erilaisuuden vuoksi ei pystytty olemaan täysin varmoja oikean analyysialueen valinnasta, jolloin analyysin ulkopuolelle voi jäädä muutoksia sisältäviä soluja. Näytteiden leikkauksien välillä kudoksesta on tehty useampia leikkeitä muihin analyyseihin, jolloin kasvainsolujen määrä on voinut merkittävästi vähentyä näytteessä. Luotettavaa analyysia varten vertailua varten tehtyt HE-lasit olisi pitänyt lähettää patologille annotointia varten, mutta toimimattoman annotaatiotyökalun vuoksi tämä ei ollut mahdollista.



Kuva 14. Näyte 1, vasemmalla skannattu vertailunäytteen HE-värjätty kudosleike ja oikealla patologin annotoitu alue kudoksesta. Oikeanpuoleinen kudosleike on leikattu aiemmin, kun näytteelle on tehty manuaalinen FISH-analyysi, vasemmanpuoleinen on leikattu myöhemmin kun on aloitettu aineiston keräys vertailua varten. Leikkeitä ei ole leikattu peräkkäin, jolloin kudoksen rakenteet poikkeavat huomattavasti toisistaan.

Leikkeiden erilaisuuden vuoksi analysoitujen solujen määrä poikkesi näytteiden 1 ja 4 manuaalisessa ja automaattisessa analyysissä huomattavasti. Analyysiohjelmalla saadut tulokset varmistetaan manuaalisesti mikroskopoimalla, varmistuksen tulokset eivät ehtineet valmistua opinnäytetyöhön. Tulosten perusteella genetiikan laboratorio arvioi vertailun tulosten riittävyyden menetelmän käyttöönottoa varten, tarvittaessa vertailu voidaan uusilla annotaatiotyökalun toimiessa annotoimalla vertailunäytteet ja uusimalla skannaus ja analyysi annotointien perusteella. Annotoitavat HE-kudosleikkeet tulisi leikata yhtä aikaa FISH-analyysiin tulevien leikkeiden kanssa, jotta voidaan paikallistaa tarkasti analysoitava alue, saadaan analysoitua varmasti samaa aluetta kudoksesta ja voidaan minimoida kasvainsolujen poisleikkautuminen analyysialueelta.

Skannaus-, analyysi- ja vertailuvaiheissa tehtiin havaintoja menetelmien ja laitteiden sekä ohjelmiston toiminnasta ja kehityskohteista. Skannausvaiheen haasteena oli usean näytteen skannaus samalle tunnisteelle, ongelma ratkaistiin laitevalmistajan ohjeiden mukaan kopioimalla tunnisteiden alainen skannaus ja nimeämällä se uudelleen. Näin saatiin saman tunnisteiden alle kaikki saman näytteen skannaukset, ja nimettyä ne ymmärrettävästi ja selkeästi. Skannauksen valmistuttua ja analysointia aloitettaessa havaittiin joissakin näytteissä taustafluoresenssin häiritsevän signaalintunnistusta. Runsaasti taustafluoresenssia sisältävät näytteet skannattiin uudelleen, käyttämällä asetuksia ja säätöjä taustafluoresenssin vähentämiseksi ja valitsemalla matalamman DAPI-fluoresenssin alueet analysoitavalta alueelta. Analyysivaiheessa haasteita tai ongelmia

ilmeni vähemmän, osassa näytteistä oli signaalikuvioita, joille ei ollut luotu luokkia analyysiohjelmaan. Tällaisia soluja oli kuitenkin niin vähän, että niillä ei ollut diagnostista merkitystä, joten ne olivat luontevinta joka tapauksessa luokitella unclassified-luokkaan. Opinnäytetyön käytännön osuuden aikatauluun ja kulkuun vaikuttivat sairaspaisaolot sekä aikataulujen yhteensovittaminen laitevalmistajan kanssa. Käytännön osuuteen oli varattu runsaasti aikaa, jolloin viivästykset eivät vaikuttaneet prosessiin negatiivisesti.

7.1 Luotettavuus

Näytteiden käsittely vaikuttaa tuloksiin ja niiden luotettavuuteen, monet preanalyttiset tekijät vaikuttavat analyysin onnistumiseen. Näytteen laadulla on myös vaikutusta analyysin tuloksiin ja luotettavuuteen. Histologisissa näytteissä kasvainsolujen paikantaminen näytteestä on tärkeää, jotta analysoidaan varmasti kasvainkudosta. FISH-prosessissa on monia virhelähteitä, jotka vaikuttavat esimerkiksi DNA:n säilyvyyteen ja hybridisaation onnistumiseen. (Chiecchio 2020.) Histologian prosessissa on otettava huomioon kudospalan riittävä fiksaatio eli kudoksen kiinnittyminen, näytteen edustavuus, kontaminaatiot tai artefaktat ja värjäyksen onnistuminen. (Mäkinen 2023 b.) Histologisen prosessin laatu vaikuttaa FISH-prosessiin, huono fiksaatio vaikuttaa DNA:n säilyvyyteen negatiivisesti. FISH-prosessissa on huomioitava parafiinin poiston onnistuminen, proteiinien riittävä pilkkoutuminen näytteessä, denaturaatioajan tarkka noudattaminen sekä reagenssien oikeaoppinen käyttö. (Chiecchio 2020.) Opinnäytetyössä käytettyjen vertailunäytteiden käsittelyprosessin kaikki vaiheet ovat luotettavia, koska jokaisessa vaiheessa on noudatettu laborioiden työ- ja menetelmäohjeita ja käytetty hyväksytyjä ja standardisoituja menetelmiä, reagensseja ja laitteita. Näytteet on otettu, käsitelty ja säilytetty ohjeita noudattaen ja varmistaen näytteiden laadukkuus ja säilyvyys.

Opinnäytetyön teknisen osan ja tietoperustan luotettavuus varmistettiin käyttämällä vain luotettavia lähteitä ja materiaaleja sekä suosittiin artikkeleista vertaisarvioituja teoksia. Lähdekritiikin avulla karsittiin materiaalista ulkopuolelle epäluotettavat ja ei-relevantit materiaalit. Suomen tiedeyhteisöjen ja Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (TENK) yhdessä laatimat toimintatavat hyvälle tieteelliselle käytännölle ovat rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus työn jokaisessa vaiheessa. (TENK 2021). Opinnäytetyön tekijä työskenteli hyvän tieteellisen käytännön mukaan.

Opinnäytetyön käytännön osan luotettavuus varmistettiin työskentelemällä genetiikan laboratorion työohjeiden, laitteiden käyttöohjeiden ja laboratorion käytäntöjen mukaan.

Näytemateriaalina käytettiin vain valikoitua aineistoa, ja analysointi suoritettiin noudattamalla hyvää tieteellistä käytäntöä. Genetiikan laboratorion ja opinnäytetyössä käytetyn testausmenetelmän ollessa akkreditoituja, laboratorion sekä työn tulokset ja laatu olivat kansainvälisten standardien vaatimalla tasolla. Akkreditointi tarkoittaa pätevyyden toteamista kansainvälisten kriteerien mukaan. (FINAS 2023.)

7.2 Eettisyys

Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto Arene ry on laatinut ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset, joiden mukaan työskennellessä voidaan parantaa opinnäytetöiden laatua, ehkäistä epärehellisyyttä ja edistää hyvää tieteellistä käytäntöä. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu luvattoman lainaamisen eli plagioinnin ja toisen henkilön tulosten tai ideoiden esittäminen omanaan eli anastamisen ehkäisy. (Kettunen & Kärki & Näreaho & Päälyssaho 2019: 3–4, 23.) Noudattamalla hyvää tieteellistä käytäntöä, lakeja ja säädöksiä ja opinnäytetyön eettisiä suosituksia, opinnäytetyön tekijän työskentely ja työn tulokset olivat eettisesti hyväksyttäviä. Opinnäytetyö tarkistettiin Turnitin-ohjelmalla, joka tunnistaa plagioinnin eli luvattoman kopioimisen.

Suomen bioanalytikkoliiton bioanalyttikon lupauksessa bioanalyttikkona työskentelevä lupaa käyttää kliinistä laboratoriotiedettä ihmiskunnan hyväksi, sekä laboratorioalan kehittämiseksi. Bioanalyttikon eettisten ohjeiden mukaan jokaisella on oikeus luottaviin laboratoriopalveluihin, bioanalyttikolla on velvollisuus ja oikeus kehittää ammattitaitoaan sekä omaksua uusia menettely- ja toimintatapoja. (Suomen Bioanalyttikkoliitto ry, 2017.) Opinnäytetyön tekijä toimi lupauksen mukaan ja noudatti eettisiä ohjeita toimiessaan laboratoriotyössä ja ollessaan mukana kehittämässä laboratorion toimintaa.

Opinnäytetyölle haettiin Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) tutkimuslupa. Tutkimuslupa haetaan kaikille opinnäytetöille, joiden kohteena ovat HUS:n potilaista peräisin olevat näytteet, ja joissa käytetään HUS:n työtiloja ja laitteita. (HUS 2024.) Opinnäytetyön tekijän käsittelemä näytemateriaali anonymisoitiin, jolloin opinnäytetyön tekijä ei työssään käsitellyt eikä tallentanut potilaiden henkilötietoja, eikä myöskään voi tunnistaa tai yhdistää näytteitä potilaisiin. Opinnäytetyön raportissa ei käsitelty Hus diagnostiikkakeskuksen näytenumeroita eikä muitakaan näytteitä identifioivia tietoja. Opinnäytetyön tekijä allekirjoitti salassapito- ja tietoturvasitoumuksen.

7.3 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyöprosessin aikana tapahtui jatkuvaa ammatillista kasvua ja kehitystä, oivallettiin uusia asioita ja osaaminen syventyi monella eri alueella. Yhteistyötaidot kehittivät, ja prosessissa verkostoiduttiin monien ammattilaisten kanssa. Alussa luotujen omien oppimistavoitteiden täyttymistä seurattiin, ja pyrittiin täyttämään tavoitteet prosessin edetessä. Opinnäytetyön aikataulu ja eteneminen muuttuivat useita kertoja, mikä loi oman haasteensa pysyä motivoituneena ja edistyä viivästyksistä huolimatta. Tavoitteena oli tuottaa laadukas ja luotettava opinnäytetyö, josta saadaan mahdollisimman suuri hyöty genetiikan laboratoriolle, joten kiirehtimistä ja mutkien suoristamista ei pidetty edes mahdollisuutena. Oppimisen ja ammatillisen kehittymisen tavoitteet olivat realistiset mutta kunnianhimoiset, ja tarkastellessa prosessin loppuvaiheilla omaa oppimista ja kehittymistä huomattiin että tavoitteet toteutuivat hyvin. Kiinnostus genetiikkaan ja patologiaan kasvoi opittujen asioiden syventyessä ja ammattitaidon kehittyessä.

Käytännön osuutta tehdessä tavoitteena oli oppia mahdollisimman paljon FISH-prosessista ja analyysistä. Manuaalista analyysia opinnäytetyön tekijä ei suorittanut, joten käytännön kokemus siitä jäi vähäiseksi. Vastapainona skannerin ja analyysiohjelman käytöstä kokemusta ja oppia saatiin valtavasti. Sopivien skannausasetusten löytäminen oli aluksi haasteellista, kokeilemalla eri versioita ja tekemällä havaintoja löydettiin sopivat asetukset ja ammattitaito kehittyi. Analysoidessa kehittyminen tapahtui nopeasti, ohjelma oli selkeä ja looginen käyttää, joka helpotti analysointia paljon. Näytteiden vaihteleva laatu toi haastetta, joka oli hyvä menetelmän testausta ja oppimista ajatellen. Vaihtelevaalaatuisten näytteiden onnistunut skannaus vaati sopivien asetusten löytämisen, sekä kehitti analysoidessa signaalien tunnistustaitoja sekä solujen rakenteen hahmottamiskykyä. Työskentely moniammatillisen ja kansainvälisen projektin osana opetti paljon yhteistyötaitoja, aikataulujen yhteensovittamista sekä lisäsi ymmärrystä geneettisten tutkimusten koko prosessista, ja tutkimusten kliinisestä merkityksestä.

Lähteet

Alaggio, R. & Amador, C. & Anagnostopoulos, I. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 36, 1720–1748 (2022). <<https://www.nature.com/articles/s41375-022-01620-2>>. Viitattu 14.12.2023.

Aust, Daniela & Baretton, Gustavo & de Back, Walter & Friedrich, Katrin & Hönscheid, Pia & Mantey, Robert & Roeder, Ingo & Sperling, Christian & Weigert, Martin & Wenke, Torsten & Zakrzewski, Falk & Zeugner, Silke 2019. Automated detection of the HER2 gene amplification status in Fluorescence in situ hybridization images for the diagnostics of cancer tissues. *Scientific Reports* 2019; 9: 8231. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6546913/>>. Viitattu 20.3.2023.

Bhat, Tariq Ahmad & Wani, Aijaz Ahmad 2017. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. *Chromosome Structure and Aberrations* 2017; 343–367. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7122835/>>. Viitattu 1.9.2023

Bioview Imaging and Analysis Solutions. Circulating Tumor Cells Detection and Characterization. <<https://bioview.com/wp-content/uploads/2020/12/BioView-CTC-brochure.pdf>>. Viitattu 14.3.2024.

Biozol Diagnostics Vertrieb GmbH. Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI. <<https://www.biozol.de/en/product/vec-h-1200>>. Viitattu 23.10.2023.

Bode, Beata & Chea, Vira & Herzog, Benjamin & Pleiner, Valerie & Schweizer, Viviane & Tinguely, Marianne 2021. Optimized workflow for digitalized FISH analysis in pathology. *Diagnostic Pathology* 2021; 16: 42. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8114497/>>. Viitattu 20.3.2023.

Broeckx, Valerie & Landuyt, Bart & Maes, Evelyne & Mertens, Inge & Prenen, Hans & Sagaert, Xavier & Schoofs, Liliane 2013. Analysis of the formalin-fixed paraffin-embedded tissue proteome: pitfalls, challenges, and future perspectives. <<https://core.ac.uk/reader/34578803>>. Viitattu 23.3.2023.

Chiecchio, Laura 2020. In situ hybridisation in tissue sections. *Diagnostic Histopathology* 2020; 26:11. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756231720301560>>. Viitattu 1.9.2023

Chrzanowska, Natalia Magdalena & Kowalewski, Janusz & Lewandowska, Marzena Anna 2020. Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors. *Molecules* 2020, 25(8), 1864. <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/8/1864>>. Viitattu 17.3.2023.

Clement, Parker W. & Liew, Michael & Miles, Rodney R. & Rowe, Leslie & Salama, Mohammed E. 2016. Validation of break-apart and fusion MYC probes using a digital fluorescence in situ hybridization capture and imaging system. *Journal of Pathology Informatics* 2016; 7:20. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4872483/>>. Viitattu 20.3.2023.

Duodecim Terveyskirjasto 2016. Lääketieteen sanasto. Pepsiiini. <<https://www.terveyskirjasto.fi/ltt02551>>. Viitattu 20.10.2023.

Finas-akkreditointipalvelu 2023. Akkreditointi. <<https://www.finas.fi/akkreditointi/Sivut/default.aspx>>. Viitattu 24.10.2023.

Green, Michael R & Yang, Haopeng 2019. Epigenetic Programming of B-Cell Lymphoma by BCL6 and Its Genetic Deregulation. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Nov 7;7:272. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6853842/>>. Viitattu 14.11.2023.

Haajanen, Kari & Pelkonen, Jani & Pärssinen, Raimo & Suominen, Ilari 2013. *Geenitekniikka*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu. Viitattu 17.3.2023.

Hell, Margreth & Jochum, Wolfram & Kradolfer, Doris & Öhlschlegel, Christian 2013. Comparison of automated and manual FISH for evaluation of HER2 gene status on breast carcinoma core biopsies. *BMC Clinical Pathology* 2013; 13:13. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3644269/>>. Viitattu 20.3.2023.

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri HUS 2024. Tutkimuslupa, opinnäytetyön tutkimuslupa ja tietolupa. <<https://www.hus.fi/tutkimus-ja-opetus/tutkijan-ohjeet/tutkimuslupa-opinnaytetyon-tutkimuslupa-ja-tietolupa#muu-tieteellinen-tutkimus-kut>>. Viitattu 6.3.2024.

Isola, Jorma & Näpänkangas, Juha & Tolonen, Teemu 2021. *Patologia, Digitaalisen patologian edut diagnostiikassa*. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 24.10.2023.

Kankainen, Matti & Kytölä, Soili & Ristimäki, Ari 2021. *Patologia. Molekyylipatologisten ja -geneettisten menetelmien merkitys patologiassa*. Kustannus Oy Duodecim 2023. Viitattu 2.11.2023.

Karttunen, Tuomo & Pääkkö, Paavo 2013. *Patologia on muutakin kuin kasvaindiagnoosi*. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 2013; 129(10): 1089-96. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo10990>>. Viitattu 20.3.2023.

Kettunen, Jyrki & Kärki, Anne & Näreaho, Susanna & Päällysaho, Seliina 2019. *Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset*. Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto Arene ry. <<https://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%20C3%84YTET%20C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?t=1578480382>>. Viitattu 20.3.2023.

Lehto, Veli-Pekka & Pohjanen, Vesa-Matti 2022. *Patologia. Proto-onkogeenistä onkogeeniin*. Kustannus Oy Duodecim 2023. Viitattu 4.12.2023.

MetaSystems Probes 2023 a. XL BCL2 BA Break Apart Probe. <<https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-6018-100-og/>>. Viitattu 14.11.2023.

MetaSystems Probes 2023 b. XL BCL6 BA Break Apart Probe. <<https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-6016-100-og/>>. Viitattu 14.11.2023.

MetaSystems Probes 2023 c. XL MYC BA Break Apart Probe. <<https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-6023-100-og/>>. Viitattu 14.11.2023.

MetaSystems Probes 2023 d. XL TP53/17cen Deletion Probe. <<https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-5103-100-og/>>. Viitattu 14.11.2023.

Mäkinen, Markus 2021. Patologia. Näytteiden käsittely laboratoriossa. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 20.3.2023.

Shakoori, Abdul Rauf 2017. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. Chromosome Structure and Aberrations. 2017 Feb 10: 343–367. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7122835/>>. Viitattu 17.3.2023.

Sigma-Aldrich 2023. SSC Buffer 20x Concentrate. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/product/sigma/s6639>>. Viitattu 23.3.2023.

Solunetti 2006. Fluoresenssimikroskopia. <<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fluoresenssimikroskopia/2/>>. Viitattu 17.3.2023.

Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalyttikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf>. Viitattu 20.3.2023.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta (TENK) 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK). <<https://tenk.fi/fi/tiedevilppi/hyva-tieteellinen-kaytanto-htk>>. Viitattu 24.10.2023

Analyysivertailu

Näyte	Koetin	Manuaalinen analyysi		Bioview-analyysi		Unclassified	Analysoidut solut (kpl)
		Signaalikuvio	Tulkinta	Signaalikuvio	Tulkinta		
Näyte 1	MYC	2F	Ei poikkeavaa	2F	89 % ei poikkeavaa		9, annotoitu alue
		1F-1G-1O	n. 90 % translokaatio	1F-1G-1O	11 % translokaatio		
				3F	Ei poikkeavaa		
	TP53	2G-2O	Ei poikkeavaa	2F			Ei signaaleja annotoidulla alueella
		2G-1O	Ei poikkeavaa	2G-1O			
	BCL2	2F	Ei poikkeavaa	2F	93 % ei poikkeavaa		14, annotoitu alue
		1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O	Ei poikkeavaa		
				3F	7 % 3 fuusiota		
	BCL6	2F	Ei poikkeavaa	2F			Ei signaaleja annotoidulla alueella
		1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O			
			3F				
Näyte 2	MYC	2F	Ei poikkeavaa	2F	48 % ei poikkeavaa	17 % (1F, 1G-1F, 1O-1F)	684, koko leike
		1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O	>1 % ei poikkeavaa		
		3F		3F	34 % 3 fuusiota		

		Valtaosassa 3–5 fuusiota					
TP53	2G-2O	Ei analysoitu	2F	36 % ei poikkeavaa	36 % (3G-3O, 3G-2O, 1G-1O, 1G-2O)	288, koko leike	
	2G-1O		2G-1O	28 % deletio			
BCL2	2F	n. 50–60 %	2F	40 % ei poikkeavaa	11 % (1F)	471, koko leike	
	1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O	5 % translokaatio			
	3F	n. 40–50 %	3F	43 % 3 fuusiota			
BCL6	2F	Ei poikkeavaa	2F	51 % ei poikkeavaa	30 % (1F, 2G-2O-1F, 1G-1O-2F)	256, koko leike	
	1F-1G-1O	Valtaosassa translokaatio	1F-1G-1O	13 % translokaatio			
			3F	6 % 3 fuusiota			
Näyte 3	MYC	2F	2F	20 % ei poikkeavaa	43 % (2G-1O-1F, 1O-1F, 2G-2O-1F, 1G-1O-2F)	211, koko leike	
		1F-1G-1O	1F-1G-1O	37 % translokaatio			
TP53	2G-2O	Ei poikkeavaa	2F	16 % ei poikkeavaa	33 % (1G, 1G-1O)	37, koko leike	
	2G-1O	56 % deletio	2G-1O	51 % deletio			
BCL2	2F	Ei poikkeavaa	2F	54 % ei poikkeavaa	40 % (1F, 1O-1F)	158, koko leike	
	1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O	3 % translokaatio			
			3F	3 % 3 fuusiota			

	BCL6	2F	Ei poikkeavaa	2F	54 % ei poikkeavaa	41 % (1F, 1O-1F)	167, koko leike
		1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O	1 % translokaatio		
				3F	4 % 3 fuusiota		
Näyte 4	MYC	2F	Ei poikkeavaa	2F	73 % ei poikkeavaa	27 % (1F)	44, annotoitu alue
		1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O	Ei poikkeavaa		
	TP53	2G-2O	Ei poikkeavaa	2F			Ei signaaleja annotoidulla alueella
		2G-1O	Ei poikkeavaa	2G-1O			
	BCL2	2F	Ei poikkeavaa	2F	43 % ei poikkeavaa	28 % (1G-2O)	7, annotoitu alue
		1F-1G-1O	Valtaosassa translokaatio	1F-1G-1O	29 % translokaatio		
	BCL6	2F	Ei poikkeavaa	2F	80 % ei poikkeavaa	16 % (1F)	79, annotoitu alue
		1F-1G-1O	Ei poikkeavaa	1F-1G-1O	2 % translokaatio		
				3F	2 % 3 fuusiota		