

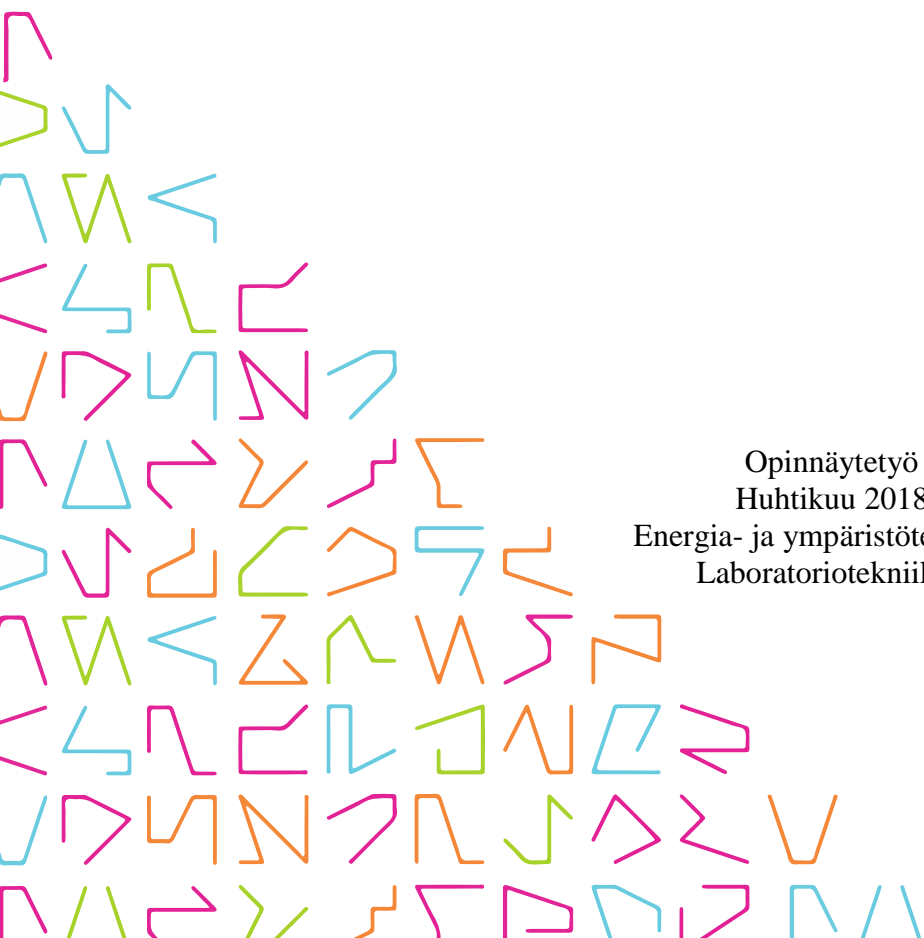


TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# RAUDAN IMEYTYMISEEN VAIKUTTAVIEN PROTEIINIEN IMMUNOVÄRJÄYKSEN OPTIMOINTI

Nelli Koivula

Opinnäytetyö  
Huhtikuu 2018  
Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboriotekniikka



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Energia- ja ympäristötekniikka  
Laboratoriotekniikka

KOIVULA, NELLI:

Raudan imeytymiseen vaikuttavien proteiinien immunovärjäyksen optimointi

Opinnäytetyö 42 sivua, joista liitteitä 1 sivu  
Huhtikuu 2018

---

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Keliakiatutkimuskeskukselle. Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida kolmen eri vasta-aineen A, B ja C immunohistokemialliset värjäysprotokollat parafiinileikkeille anemiaan ja keliakiaan liittyvää tutkimusta varten. Tarkoituksena oli suorittaa immunovärjäyksiä parafiinileikkeille ja arvioida niiden värjäytymisen laatua mikroskopoimalla sekä tehdä värjäytymistä parantavia muutoksia protokolliin. Protokollat pohjautuivat yleisiin parafiinileikkeiden immunovärjäystekniikoihin. Käytettyjen vasta-aineiden nimet on poistettu julkisesta raportista salassa pidettävien tietojen takia.

Opinnäytetyössä saatiin optimoitua kaikkien kolmen vasta-aineen värjäysprotokollat ja suoritettua värjäykset kaikille näytteille. Vasta-aine A:lle suoritettiin kolme kokeilua, B:lle neljä ja C:lle kuusi, joiden jälkeen vasta-aineen sitoutumiskohdan ja saadun värin voimakkuuden perusteella protokollat todettiin optimoiduiksi. Optimoiduilla protokollilla värjättiin 37 potilaan ja kontrollien näytesarja.

Saatuja tuloksia käytetään tutkimuksessa keliakiasta ja anemiasta. Optimoituja protokollia ja niiden tuloksia tullaan hyödyntämään Keliakiatutkimuskeskuksen tutkimuksissa. Jatkotutkimusehdotuksena olisi testata optimoitujen protokollien toistettavuutta toisilla potilasnäytteillä.

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Engineering

KOIVULA, NELLI:

Optimizing the Immunostaining of Proteins Affecting Iron Absorption

Bachelor's thesis 42 pages, appendices 1 page  
April 2018

---

This thesis was done for the Celiac Disease Research Center of the University of Tampere, as a part of an ongoing study about celiac disease and anemia. The objective was to optimize the protocols for immunohistochemical staining of paraffin-embedded tissue sections for three different antibodies A, B and C. The purpose was to conduct immunostaining of the paraffin-embedded tissue sections of small intestine, to evaluate the quality of staining by microscope, and to make alterations to achieve better staining quality. The protocols were based on common techniques used in immunostaining for the paraffin-embedded tissue sections. Names of antibodies were excluded from the public version of this thesis for confidential reasons.

The optimization of protocols for all three antibodies was successful, and immunostainings were done for all of the tissue section samples. Three protocol tests were done for antibody A, four tests for B and six for C. After the testing, the optimal protocols were chosen on basis of staining quality: the binding position of the antibody and the intensity of staining. The control samples and 37 samples from patients were stained using the optimized protocols.

The results of immunostaining are used in the study focusing on the connection between celiac disease and anemia. The optimized protocols and their results can be used in the forthcoming studies at the Celiac Research Center. For further research the repeatability of the optimized staining protocols should be examined.

---

Key words: celiac disease, anemia, immunostaining, antibody

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	TEORIA .....	6
2.1	Keliakia.....	6
2.1.1	Imeytymishäiriöt ja puutostilat keliakiassa.....	7
2.1.2	Anemia keliakiassa.....	7
2.2	Immunovärjäyksen periaatteita.....	8
2.3	Parafiinileikkeiden värjäyksen periaatteita.....	9
3	TYÖN SUORITUS .....	11
3.1	Näytteet.....	11
3.2	Vasta-aine A .....	11
3.2.1	Vasta-aine A:n ensimmäinen kokeiltu protokolla.....	12
3.2.2	Vasta-aine A:n protokollan muutokset ja optimoitu protokolla....	14
3.3	Vasta-aine B.....	15
3.3.1	Vasta-aine B:n ensimmäinen kokeiltu protokolla.....	15
3.3.2	Vasta-aine B:n protokollan kehitys ja optimoitu protokolla.....	16
3.4	Vasta-aine C.....	17
3.4.1	Vasta-aine C:n ensimmäinen kokeiltu protokolla.....	18
3.4.2	Vasta-aine C:n kokeillut muutokset ja optimoitu protokolla.....	19
3.5	Mikroskopointi.....	20
4	TULOKSET .....	21
4.1	Vasta-aine A:n kokeiluvaiheen tuloksia .....	21
4.2	Vasta-aine A:n optimoidun protokollan tulokset.....	23
4.3	Vasta-aine B:n kokeiltujen protokollien tulokset .....	24
4.4	Vasta-aine B:n optimoidun protokollan tulokset .....	29
4.5	Vasta-aine C:n välitulokset.....	30
4.6	Vasta-aine C:n optimoidun protokollan tulokset .....	37
5	POHDINTA.....	39
	LÄHTEET.....	41
	LIITTEET .....	42
	Liite 1. Liuostaulukko .....	42

## 1 JOHDANTO

Keliakia on autoimmuunityyppinen sairaus, jossa ravinnosta saatu gluteeni aiheuttaa ohutsuolen limakalvon vaurion. Keliakian ainoa hoito on gluteeniton ruokavalio, jolloin ravinnosta poistetaan gluteenia sisältävät viljat vehnä, ohra ja ruis. Ohutsuolen limakalvovaurion takia jotkut ravintoaineet voivat jäädä imeytymättä hoitamaton keliakiaa sairastavilla. Anemia on yksi yleisimmistä puutostiloista keliakikoilla ja tavallisesti sen aiheuttaa raudan ja foolihapon heikentynyt imeytyminen. (Mäki, Collin, ym. 2006, 27.) Anemian liittymistä keliakiaan ja sen taustalla olevia syitä voidaan tutkia immunovärväimällä raudan imeytymiseen vaikuttavia proteiineja potilailta otetuista ohutsuolileikkeistä.

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Keliakiatutkimuskeskukselle keväällä 2018. Opinnäytetyö liittyi Marleena Revon väitöskirjaan ja tutkimukseen: anemia ja raudanpuute keliakiassa. Opinnäytetyö toteutettiin, koska kolmea tutkimuksessa mukana ollutta vasta-ainetta ei ollut saatu vielä optimoitua. Opinnäytetyön tavoite oli optimoida kolmen eri vasta-aineen A, B ja C immunohistokemialliset värjäysprotokollat parafiinileikkeille anemiaan ja keliakiaan liittyvää tutkimusta varten. Opinnäytetyön tarkoituksena oli suorittaa immunovärjäyksiä parafiinileikkeille ja arvioida niiden värjäytymisen laatua mikroskoipoimalla, sekä tehdä värjäytymistä parantavia muutoksia protokoliin.

## 2 TEORIA

### 2.1 Keliakia

Keliakia on autoimmuunityyppinen sairaus tietyn perimän omaavilla ihmisillä. Siinä ravinnosta saatu gluteeni aiheuttaa ohutsuolen limakalvovaurion ja muutoksia ruuansulatuskanavan ulkopuolisissa elimissä. (Mäki, Collin, ym. 2006, 18.) Keliakian tyypillisimmät oireet ovat ripuli tai löysät ulosteet, vatsakipu ja vatsan turvotus. Suoliston ulkopuolisia oireita ovat tyypillisesti erilaiset niveloireet, hedelmättömyys, alentunut luuston tiheys sekä jotkin neurologiset oireet (Salmi, Lindfors, ym. 2017). Keliakiaa voi esiintyä myös iholla tai se voi olla kokonaan oireeton. (Mäki, Collin, ym. 2006, 33–34.) Ihokeliakiassa potilaalle on kehittynyt rakkulainen ja kutiseva ihottuma tyypillisesti polviin, kyynärpäihin ja pakaroihin (Salmi, Lindfors, ym. 2017).

Keliakian hoitona toimii tällä hetkellä ainoastaan elinikäinen gluteeniton ruokavalio. Hoidon tarkoituksena on ehkäistä oireita sekä estää esimerkiksi osteoporoosin ja ohutsuolen lymfooman kehittyminen. Gluteenittoman ruokavalion lisäksi ihokeliakikoilla voidaan aloittaa dapsonilääkehoito, jolla pyritään rauhoittamaan ihottuma. (Salmi, Lindfors, ym. 2017.)

Keliakia diagnosoidaan potilaalta ohutsuolen limakalvon koepalasta, josta todetaan vilusatrofia, kryptahyperplasia ja tulehdussolujen lisääntynyt määrä. Koepalan lisäksi mitataan verestä transglutaminaasi- tai endomysiumvasta-aineita, mutta ne eivät yksinään riitä keliakiadiagnoosin tekemiseen. (Käypähoito, keliakia.) Transglutaminaasi- ja endomysiumvasta-ainetestit tunnistavat samaa antigeeniä eli kudostransglutaminaasia, TG2. Molemmat testit havaitsevat hoitamattoman keliakian herkästi, joskin kaupallinen transglutaminaasivasta-ainetestti on alttiimpi vaihteleville tuloksille, riippuen valmistajan suosittamista proteiinin puhdistus- ja kiinnitysmenetelmistä. (Salmi, Lindfors, ym. 2017.)

Gluteeni on sitkomassaa, joka jää jäljelle, kun jyvän ydinosasta on poistettu vesiliukoinen tärkkelys. Tähän massaan kuuluu prolamiinit (valkuaisaineet): gliadiini ja gluteeniini, jotka aiheuttavat oireita ja suolivaurion keliakiassa. Näistä vehnän sisältämä gliadiini on tunnetuin aminohappokoostumukseltaan. (Mäki, Collin, ym. 2006, 19.) Gluteenittomassa

ruokavaliossa poistetaan kaikki vehnää, ohraa ja ruista sisältävät ruoat. Poistetut viljatuotteet pitää korvata gluteenittomilla viljoilla, kuten maissilla, riisillä tai tattarilla, jotta keliakikko saa tarvittavat ravintoaineet. (Mäki, Collin, ym. 2006, 82.)

### **2.1.1 Imeytymishäiriöt ja puutostilat keliakiassa**

Keliakiaa sairastavilla ravinnon gluteeni vaurioittaa ohutsuolen limakalvoa. Limakalvovaurion takia ravintoaineiden imeytyminen voi häiriytyä ja hoitamaton keliakiaa sairastavalla voidaan monesti todeta ravintoaineiden puutostiloja. Limakalvon vaurioitumiseen vaikuttavat monet asiat, esimerkiksi ravinnosta saatu gluteenin määrä, herkkyys gluteenille ja sairauden kesto. Monesti ohutsuolen pahin limakalvovaurio sijaitsee ohutsuolen yläosassa. (Mäki, Collin, ym. 2006, 26.)

Yleisimpiä puutostiloja keliakiaa sairastavilla ovat vitamiinipuutokset, varsinkin niiden vitamiinien osalta, jotka imeytyvät ohutsuolen yläosasta, erityisesti rasvaliukoisten vitamiinien, esimerkiksi A, D, E ja K (Mäki, Collin, ym. 2006, 28). Joskus myös B<sub>12</sub>-vitamiinin puutos voi kertoa keliakiasta (Käypähoito, keliakia). Myös kalsiumin puute ja seerumin kokonaiskolesterolipitoisuuden pieneneminen ovat yleisiä hoitamaton keliakiaa sairastavilla. (Mäki, Collin, ym. 2006, 28.)

### **2.1.2 Anemia keliakiassa**

Tavallisin poikkeavuus, joka todetaan keliakiapotilailla laboratoriotutkimuksissa, on anemia. Monesti sen syynä on raudan ja foolihapon heikentynyt imeytyminen ohutsuolen yläosasta. Epiteelisolujen nopeutunut menetys voi osaltaan lisätä keliakiassa raudanpuutetta, sillä epiteelisoluilla on suuri merkitys raudan imeytymiseen. (Mäki, Collin, ym. 2006, 27.)

Anemiassa potilaan veren hemoglobiiniarvo on normaalia alhaisempi. Alaraja miehillä normaaliin hemoglobiiniin on 134 g/l ja naisilla 117 g/l. Anemia johtuu veren punasolujen vähydestä tai niiden sairaudesta. Foolihappoa ja B<sub>12</sub>-vitamiinia tarvitaan punasolujen ja hemoglobiinin muodostamisessa, jolloin niiden puute aiheuttaa anemian. (Terveyskir-

jasto, B<sub>12</sub>-vitamiinin tai foolihapon puutos 2017.) Raudan imeytymiseen vaikuttavia proteiinien määrää ja sijaintia erityisesti ohutsuolen limakalvolla voidaan havainnoida immunovärjäyksillä.

## 2.2 Immunovärjäyksen periaatteita

Polyklonaalinen vasta-aine voi sitoutua useisiin eri epitooppeihin antigeenissään. Usein polyklonaaliset vasta-aineet on valmistettu kanissa, ja muita valmistukseen usein käytettyjä eläimiä ovat vuohi ja hevonen. Samasta kloonista olevat monoklonaaliset vasta-aineet ovat immunohistokemiallisesti identtisiä ja reagoivat vain yhteen epitooppiin antigeenissä. Yleisin eläin monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseen on hiiri. (Immunochemical staining methods, 2001, 7.)

Vasta-aineen sopiva laimennospitoisuus haetaan tekemällä kokeilusarja eri laimennoksilla. Laimennosta arvioidaan sen värjäytymisen voimakkuuden ja taustan värjäytymisen mukaan. Erityisesti monoklonaalisia vasta-aineita laimennettaessa pitää ottaa huomioon laimennusliuoksen pH, koska monoklonaaliset vasta-aineet ovat herkempiä pH:lle tarkan molekyylikonformaationsa takia. (Immunochemical staining methods, 2001, 12.)

Vasta-aineen inkubaatioaika riippuu käytetystä vasta-ainelaimennoksen pitoisuudesta. Periaatteessa inkubaatioaika lyhenee, mitä vahvempi vasta-ainelaimennos on käytössä. Primaarivasta-aineen inkubaatioaika vaihtelee 10 minuutista 48 tuntiin. Inkubointilämpötila riippuu inkuboinnin pituudesta ja vasta-aineen laimennoksesta. Yli yön kestäville inkuboinneille käytetään yleensä 4 °C lämpötilaa. (Immunochemical staining methods, 2001, 13.)

Entsyymi-substraatti-reaktiota käytetään immunovärjäyksissä muodostamaan värittömästä kromogeenista värillinen lopputuote. Osa entsyymeistä (elävän aineen katalyytit) on todella tarkkoja ja sitoutuvat vain tiettyihin substraatteihin, mutta osa on vähemmän tarkkoja ja ne voivat sitoutua moniin eri substraatteihin. Entsyymattinen aktiivisuus riippuu monista asioista, kuten entsyymin ja substraatin konsentraatioista, pH:sta, lämpötilasta ja puskuriliuoksen suolapitoisuudesta. (Immunochemical staining methods, 2001, 14.)



Entsyymi-substraattikompleksi hapettaa kromogeenin, jolloin syntyy värillinen tuote. Kromogeeni on siis elektronin luovuttaja ja esimerkkejä ovat 3,3-diaminobentsidiini (DAB), 3-amino-9-etyylikarbatsoli (AEC) ja 4-kloro-1-naftoli (CN). Esimerkiksi, opinäytetyön protokollissa käytetty, AEC muodostaa hapettumisen aikana punaisen loppu-tuotteen, joka on alkoholiin liukeneva. Siitä syystä käytetyn petausaineen suositellaan olevan vesipohjainen. Altistuessaan valolle värjätyt leikkeet menettävät hiljalleen värin intensiteettiään, koska AEC jatkaa hapettumistaan valon vaikutuksesta. (Immunohistochemical staining methods, 2001, 15.)

### 2.3 Parafiinileikkeiden värjäyksen periaatteita

Parafiinin poisto voidaan suorittaa perinteisesti ensin poistamalla parafiini esimerkiksi ksyleenillä. Ksyleeni täytyy vaihtaa ajoittain (50 ml ksyleeniä toimii noin 50 lasille), jotta sen toimintakyky säilyy ja irronnut parafiinivaha ei kerääntyy leikkeisiin. Parafiinin poiston jälkeen leikkeet pitää palauttaa vesifaasiin (rehydraatio). Tämä on yleisesti tehty laskevan alkoholisarjan avulla alkaen absoluuttisesta etanolista. Alkoholisarjan viimeinen liuos on ollut vesi. Nämä vaiheet voidaan myös tehdä valmiilla kaupallisilla menetelmillä, jotka ovat tarkoitettu parafiinin poistoon ja rehydraatioon. Kaupalliset menetelmät eivät kuitenkaan välttämättä poista parafiinin kertymisestä aiheutuvaa ongelmaa. (Immunohistochemical staining methods, 2013, 25–26.)

Ennen leikkeen valamista parafiiniin sen kiinnitys formaliinilla voi aiheuttaa halutun epitoopin katoamisen ja vaikuttaa näin halutun antigeeni-vasta-aine parin muodostumiseen. Epitoopin paljastus, (antigen/epitope retrieval), jolla haluttu epitooppi paljastetaan värjäystä varten, suoritetaan yleensä kiehuva puskurissa, jossa parafiinileikkeiden annetaan olla epitoopille sopiva aika. Puskuri, pH ja aika ovat epitoopista ja kudoksesta riippuvia, mutta monesti keittoaika on 30 min. Yleisimpiä käytettyjä puskureita ovat 0,01 M sitraattipuskuri (pH 6) ja Tris-puskuroitu saliini (TBS) (pH 7,4). (Buchwalow & Böcker. 2010. 6.1.1.)

Endogeenisen peroksidaasin blokkaukseen suoritetaan usein metanolissa, johon on lisätty vetyperoksidia. Metanolin tilalla voi käyttää fosfaattipuskuroitua saliinia (PBS), jos on epäiltävissä, että metanoli vähentäisi kudoksen pinnassa olevien antigeenien värjäytymistä. Endogeenisen peroksidaasin blokkaukseen tehdään, jotta joidenkin kudosten ja solujen sisältämä endogeeninen peroksidaasi ei värjäisi taustaa. (Buchwalow & Böcker. 2010. 5.2.)

### 3 TYÖN SUORITUS

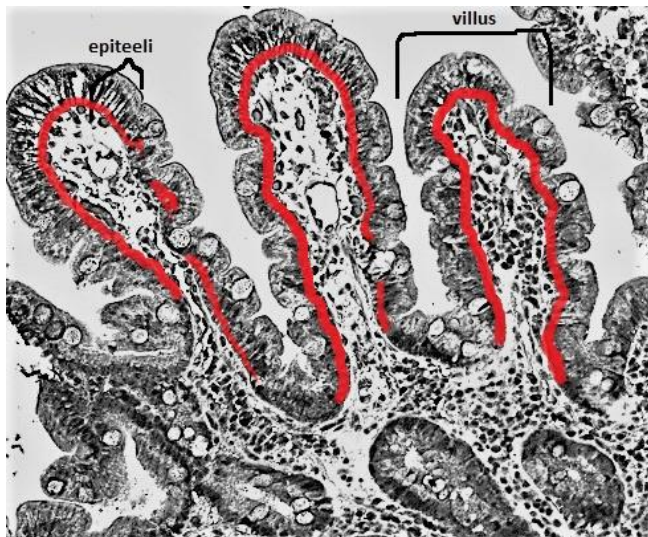
#### 3.1 Näytteet

Näytteinä työssä oli potilailta ohutsuolen täyhystyksen yhteydessä otettuja koepaloja, joista oli valmistettu leikkeitä. Koepalat olivat koottu Tampereen yliopiston keliakiatutkimuskeskuksen prospektiivisesti ylläpidetyistä potilassarjoista. Kaikki leikkeet oli leikattu marraskuussa vuonna 2016 keliakiatutkimuskeskuksessa. Koko näytesarja sisälsi yhteensä 37 potilaan ja kuuden kontrollin koepaloista valmistettuja leikkeitä. Potilaista osa oli todettu aiemmin anemiasa sairastaviksi ja osalla ei ollut todettu anemiasa. Osalla potilaista oli todettu totaali villusatrofia (TVA), osittainen tai subtotaali villusatrofia (PSVA) tai potentiaalinen keliakia (POT). Diagnoosit oli tehty aiemmin keliakian diagnosoinnin yhteydessä (Repo, 2015).

Yhdellä objektilasilla oli yleensä leikkeitä kahdelta eri potilaalta, joilta molemmilta oli lasilla kaksi parafinileikettä (neljä leikettä lasilla). Kontrollileikkeet olivat omilla objektilaseillaan, paitsi kontrolli 130B, joka oli potilaan 117 leikkeen kanssa samalla lasilla. Kontrolleja k3, k4, k5 ja k6 oli laitettu aina neljä saman kontrollin leikettä yhdelle objektilasille. Edellä mainittujen lasien lisäksi oli kymmenen kappaletta objektilaseja, joilla oli potilaiden 1, 2, 6 ja 8 leikkeet (neljä leikettä lasilla). Laseilla olleet leikemäärät vaikuttivat tehtyjen reagenssien määriin värjäyksessä, esimerkiksi tarvittujen vasta-ainelaimennosten määriin. Jokaisen potilaan leike värjättiin rinnakkaisina näytteinä lopullisissa optimoiduissa värjäyksissä, johtuen leikkeiden sijoittelusta laseille.

#### 3.2 Vasta-aine A

Vasta-aine A:n piti sitoutua epiteelin alapinnalle ohutsuolen pintakerroksessa, eli proteiini A:ta piti teoreettisesti olla ainakin ohutsuolen ulkokerroksessa (Protein Atlas). Kuvassa 1 on punaisella havainnollistettu vasta-aine A:n teoreettista sitoutumisaluetta. Tutkimuksen kannalta proteiinien paikat ohutsuolen pintakerroksessa olivat kiinnostavimmat, koska keliakian vaikutukset näkyvät yleensä ensiksi villuksissa ja epiteelissä (Mäki, Collin, ym. 2006, 21).



KUVA 1. Vasta-aine A:n oletettu sitoutumiskohta ohutsuolen pintakerroksessa (Kuva: Katri Lindfors & Nelli Koivula 2018)

Vasta-aine oli A (Thermo Fisher Scientific), joka oli tuotettu hiiressä. Se oli monoklaonainen ja ei-konjugoitu. Sitä säilytettiin pakastimessa ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )  $20\text{ }\mu\text{l}$ :n alierissä eppendorf-putkissa. Jako alieriin oli tehty keliakiatutkimuskeskuksessa alkuperäisestä  $100\text{ }\mu\text{g}$ :sta.

### 3.2.1 Vasta-aine A:n ensimmäinen kokeiltu protokolla

Ensimmäinen kokeiltu protokolla aloitettiin parafiinin poistolla, deparafioinnilla, joka suoritettiin pitämällä objektilasia ksyleenissä 10 minuuttia ja se toistettiin kolme kertaa. Malja, jossa ksyleenikäsittely tapahtui, oli ravistelijassa. Deparafioinnin jälkeen leikkeet saatettiin takaisin vesifaasiin (rehydraatio) laskevan alkoholisarjan avulla. Lasit laitettiin ensin neljäksi minuutiksi absoluuttiseen etanoliin, ja toistettiin kaksi kertaa. Sen jälkeen lasit laitettiin 96 % etanoliin neljäksi minuutiksi, ja toistettiin kaksi kertaa. Tämän jälkeen tehtiin kaksi kertaa yhden minuutin käsittely 70 % etanolissa ja kaksi kertaa yhden minuutin käsittely 50 % etanolissa. Viimeiseksi lasit käsiteltiin vesijohtovedellä kaksi kertaa neljän minuutin ajan. Tätä taulukossa 1 esitettyä deparafiointia ja rehydraatiota käytettiin jokaisessa lopullisessa protokollassa.

TAULUKKO 1. Deparaffiointi ja rehydraatio

aine	aika (min)	toistot
ksyleeni	10	3
100 % EtOH	4	2
96 % EtOH	4	2
70 % EtOH	1	2
50 % EtOH	1	2
vesi	4	2

Haluttu epitooppi paljastettiin kudoksesta upottamalla lasit kiehuvaan sitraattipuskuriin. Puskurin kantaliuos oli 0,1 molaarinen ja sen valmistusohjeet löytyvät liitteestä 1. Puskurin pH tarkistettiin ja säädettiin 6,0 suolahapolla. Käyttöliuos oli kantaliuoksen kymmenkertainen laimennos ionivaihdettuun veteen. Vasta-aine A:n epitooppia varten objektilaseja, joilla leikkeet olivat, keitettiin kiehuvaan puskurissa 30 minuuttia. Keittäminen tapahtui dekanterilasissa keittolevyllä. Keiton jälkeen laseja jäähdytettiin puskurissa seitsemän minuuttia huoneenlämmössä ennen kuin suoritettiin kaksi viiden minuutin PBS-pesua maljoissa. PBS-kantaliuoksen teko-ohjeet löytyvät liitteestä 1. Käyttöliuos oli kymmenkertainen laimennos kantaliuoksesta.

Endogeenisen peroksidaasin blokkaukseen suoritettiin metanolissa, johon oli lisätty vetyperoksidia (0,3 %). Laseja pidettiin maljassa ravistelijassa 30 minuuttia, jonka jälkeen lasit pestiin PBS-liuoksella. Pesu kesti viisi minuuttia. Tämän jälkeen objektilasilla olevat kudokset leikkettiin ympyröitiin hydrofobisella rajaustussilla (ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen), jolloin leikkeelle pipetoitavat reagenssit eivät levinneet koko objektilasille. Tämän jälkeen ei-spesifisen värjäytymisen blokkaukseen suoritettiin kosteassa kammiossa vaakatasossa valmiilla kaupallisella ImmPRESS Reagent AntiMouse Ig – reagenssilla (Vector Labs). Reagenssi oli tuotettu hiiressä ja se sisälsi 2,5 % hevosen normaali-serumia. Liuos annosteltiin pullosta jokaisen leikkeen päälle, noin yksi pisara leikettä kohden. Blokkaukseen kesti 20 minuuttia ja tapahtui huoneenlämmössä.

Blokkauksen jälkeen leikkeiltä kopautettiin ylimääräinen reagenssi pois, ja tilalle pipetoitiin A primaarivasta-aine. Vasta-aine oli laimennettu 1:100 ja laimennusliuoksena oli 0,1 % BSA-PBS. BSA-PBS:n valmistusohjeet ovat liuostaulukossa liitteessä 1. Vasta-ainelaimennosta pipetoitiin jokaisen leikkeen päälle 30 µl:aa. Primaarivasta-aineen inkubaatio kesti yön yli ja se suoritettiin 4 °C:ssa jääkaapissa kosteassa kammiossa.

Inkubaation jälkeen suoritettiin yksi viiden minuutin PBS-pesu. Tämän jälkeen leikkeille annosteltiin valmis ImmPRESS-peroksidaasireagenssi (Vector Labs), ja sitä inkuboitiin huoneenlämmössä kosteassa kammiossa 30 minuuttia. Tämän jälkeen lasit pestiin PBS-liuoksella yhden kerran viiden minuutin ajan. Pesun jälkeen lasille pipetoitiin AEC-substraatti, joka oli valmistettu asetaattipuskurista (1680 µl), 3 % vetyperoksidista (18 µl) ja AEC-formamidista (120 µl). Substraattia pipetoitiin jokaiselle leikkeelle 30 µl:aa ja inkubaatio tapahtui kosteassa kammiossa huoneenlämmössä 20 minuutin ajan. Asetaattipuskuri oli valmistettu 0,1 N:sta etikkahaposta (10,5 ml) ja 0,1 M natriumasetaattiliuoksesta (39,5 ml). Asetaattipuskurin pH oli 5,2.

AEC-substraatin jälkeen lasia pestiin viisi minuuttia juoksevan hanaveden alla. Sen jälkeen lasit kastettiin yksitellen kolme kertaa Harrisin reagenssiin (Merck), jonka jälkeen lasit laitettiin uudelleen viideksi minuutiksi juoksevan veden alle pesuun. Viimeiseksi lasit laitettiin kuivamaan 15 minuutiksi vetokaappiin, jonka jälkeen leikkeitten päälle laitettiin pisara Vectamount Aqva- petausainetta ja peitinlasi.

Ensimmäinen kokeilu suoritettiin 11 objektilasilla, koska protokollan piti olla optimoitu. Laseilla oli potilaiden 1-54 leikkeet. Tarvittavat liuosmäärät primaarivasta-aineeseen ja AEC-substraattiin laskettiin leikkeiden lukumäärän perusteella.

### **3.2.2 Vasta-aine A:n protokollan muutokset ja optimoitu protokolla**

Toinen kokeilu suoritettiin muuten samalla protokollalla kuin ensimmäinen, mutta pesuihin lisättiin PBS:n joukkoon 0,1 % Triton X-100. Primaarivasta-aineen laimennos pysyi samana eli 1:100. Kokeilu suoritettiin kahdella objektilasilla, joista ensimmäisellä oli potilaiden 21 ja 27 leikkeet ja toisella lasilla oli kontrolli kuuden (k6) leikkeet.

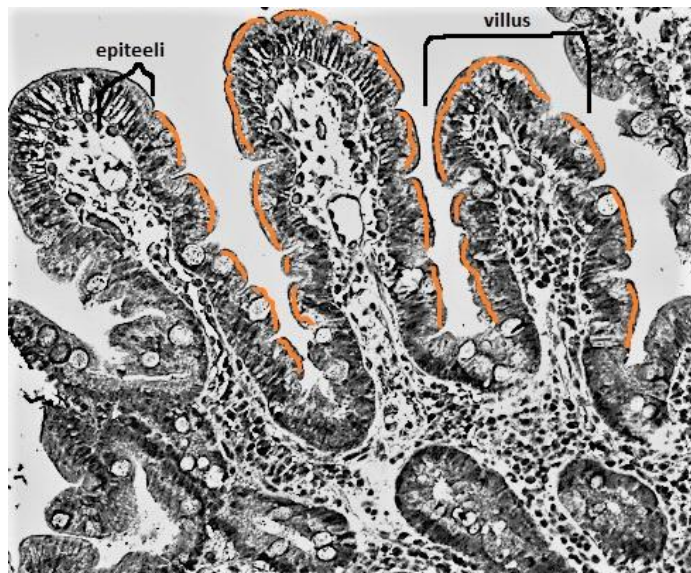
Kolmas kokeilu suoritettiin ensimmäisen ja toisen kokeilun tapaan, mutta primaarivasta-ainetta laimennettiin lisää. Sen laimennos oli 1:150. Kokeilu suoritettiin objektilaseilla, joista ensimmäisellä oli potilaiden 1 ja 2 leikkeet ja toisella 117 ja kontrolli 130B:n leikkeet.

Vasta-aine A:n lopullinen protokolla oli sama kuin kolmas kokeiltu protokolla. Siinä eroina oli alkuperäiseen protokollaan pesuissa mukana ollut Triton X-100, jota oli

PBS:ssa seassa 0,1 %. Vasta-aine laimennettiin 1:150 ja laimennusliuoksena oli 0,1 % BSA-PBS. Koko näytesarja värjättiin kolmessa erässä. Yhdessä erässä mukana oli aina kahdeksan eri objektilasia.

### 3.3 Vasta-aine B

Vasta-aine B:n piti sitoutua teoreettisesti epiteelin pintakerrokseen aivan epiteelin ulkoreunaan, eli proteiini B:n teoreettisen sijainnin kohdalle ohutsuolen ulkokerroksessa (Protein Atlas). Kuvassa 2 on esitetty B:n teoreettinen värjäytymispaikka oranssilla värillä.



KUVA 2. Vasta-aine B:n oletettu sitoutumiskohta ohutsuolen ulkokerroksessa (Kuva: Katri Lindfors & Nelli Koivula 2018)

Vasta-aine oli Anti-B (Abcam) ja se oli tuotettu kanissa. Valmistajan ilmoittama konsentraatio oli  $0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ . Vasta-aine B oli polyklonaalinen. Sitä säilytettiin pakastimessa  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  ja se oli jaettu Keliakiatutkimuskeskuksessa  $20 \mu\text{l}$ :n alieriin.

#### 3.3.1 Vasta-aine B:n ensimmäinen kokeiltu protokolla

Parafiinin poisto ja leikkeiden saattaminen takaisin vesifaasiin suoritettiin samalla tavoin kuin vasta-aine A:n protokollassa (3.2.1 Vasta-aine A:n ensimmäinen kokeiltu protokolla, 12). Epitooopin paljastus suoritettiin samassa puskuriliuoksessa (natriumsitraattipuskuri)

kuin vasta-aine A:n, mutta leikkeiden keittoaika oli 20 minuuttia ja puskurissa jäähtymisaika oli 20 minuuttia. Jäähdyttämisen jälkeen näytteet pestiin PBS:lla maljoissa kaksi kertaa viisi minuuttia.

Endogeenisen peroksidaasin blokkaukseen suoritettiin maljassa, jossa oli 50 ml:a PBS:a ja 150 µl:a vetyperoksidia (0,3 %). Blokkaukseen kesti 30 minuuttia ja tapahtui maljassa ravistelijassa. Tämän jälkeen lasit pestiin PBS:lla viiden minuutin ajan. Pesun jälkeen leikkeet rajattiin rajaustussilla.

Ei-spesifinen värjäytyminen estettiin pipetoimalla leikkeiden päälle 5 % hevosen normaaliseerumi, joka oli valmistettu BSA-maitojauhe liuokseen. BSA-maitojauhe-liuoksen teko-ohjeet ovat liitteessä 1. 5 % hevosen normaaliseerumi valmistettiin pipetoimalla pienen lasiputkeen 20 µl:a hevosen normaaliseerumia ja 380 µl:a BSA-maitojauheliuosta. Leikkeitä inkuboitiin 20 minuuttia kosteassa kammiossa vaakatasossa.

Blokkauksen jälkeen leikkeiltä kopautettiin ylimääräinen blokkauksliuos pois ja tilalle pipetoitiin primaarivasta-aine. Vasta-aine oli laimennettu 1:50 ja laimennusliuoksena oli PBS. Inkubointi suoritettiin kosteassa kammiossa yön yli jääkaapissa 4 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen laseja pestiin PBS:lla viisi minuuttia. Seuraavaksi leikkeille annosteltiin kaupallinen valmis ImmPRESS-peroksidaasireagenssi Anti rabbit Ig (Vector Labs). Sen kanssa leikkeitä inkuboitiin kosteassa kammiossa 30 minuuttia, jonka jälkeen suoritettiin yksi viiden minuutin PBS-pesu.

Protokolla eteni tästä eteenpäin kuten vasta-aine A:n protokolla. Kokeilu suoritettiin kahdella objektilasilla, joista ensimmäisellä oli potilaiden 71 ja 72 leikkeet ja toisella lasilla oli kontrolli neljän (k4).

### **3.3.2 Vasta-aine B:n protokollan kehitys ja optimoitu protokolla**

Vasta-aine B:n toinen kokeiltu protokolla oli muuten ensimmäisen mukainen, mutta primaarivasta-aineen laimennos vaihdettiin laimeammaksi 1:100. PBS-pesuihin laitettiin mukaan vasta-aine A:n tavoin 0,1 % Triton X-100. Kokeilu tehtiin kahdella objektilasilla, joista ensimmäisellä oli potilaiden 64 ja 65 leikkeet ja toisella oli kontrolli neljän (k4) leike.



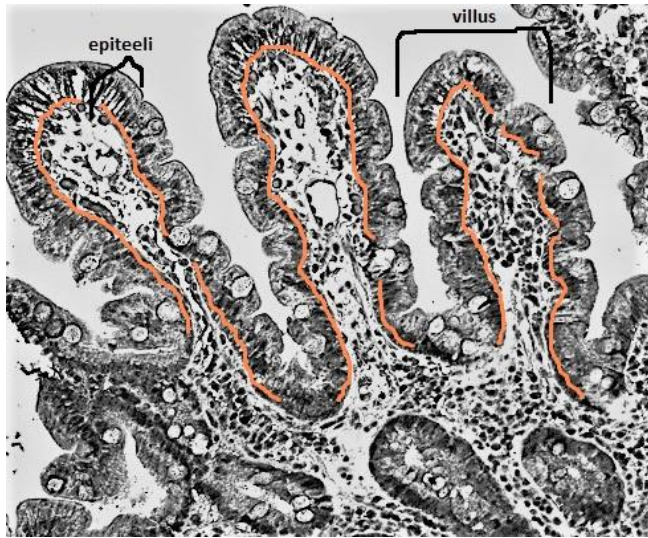
Vasta-aine B:n kolmas kokeilu suoritettiin ensimmäisen protokollan mukaan, mutta epi-toopin paljastuspuskuri vaihdettiin Tris-EDTA-Tween20 – puskuriksi. Tris-EDTA-liuoksen kantaliuoksen valmistusohjeet ovat esitetty liitteessä 1. Liuoksen pH tarkistettiin ja säädettiin suolahapolla pH:ksi 9,00. Käyttöliuos valmistettiin kantaliuoksesta 1:20 laimennoksena päivittäin. Käyttöliuosta tarvittiin yhtä värjäystä varten 400 – 500 ml:a. Käyttöliuos valmistettiin 500 ml mittapulloon. Siihen laitettiin 25 ml kantaliuosta ja 0,25 ml Tween20 -reagenssia ja täytettiin ionivaihdetullavedellä merkkiin. Objektilaseja pidettiin kiehuvaan puskurissa 20 minuuttia ja jäähdytettiin siinä 20 minuuttia. Ei-spesifisen värjäytymisen blokkauksiliuos vaihdettiin valmiiseen kaupalliseen ImmPRESS-reagenssiin (Vector Labs), joka oli tuotettu kanissa ja sisälsi 2,5 % hevosen normaaliseroomia. Blokkauksen kesto 20 minuuttia. Primaarivasta-aineen laimennos oli 1:50. Kolmas kokeilu suoritettiin kahdella objektilasilla, joissa kummassakin oli leike potilailta 1, 2, 6 ja 8.

B:n neljäs kokeiltu protokolla suoritettiin samalla tavoin kuin kolmas kokeilu, mutta primaarivasta-aineen laimennoksina kokeiltiin 1:100 ja 1:150. Kummallakin laimennoksella tehtiin yksi objektilasi eli neljä leikettä. Kokeilu suoritettiin lasilla, joissa molemmissa oli potilaiden 1, 2, 6 ja 8 leikkeet.

Lopullinen protokolla, jolla sarja värjättiin, oli neljännen kokeilun mukainen protokolla. Siinä primaarivasta-aineen laimennos oli 1:150. Sarja värjättiin kolmessa osassa, joista jokaisessa oli kahdeksan lasia.

### **3.4 Vasta-aine C**

Vasta-aine C:n teorettinen sijainti oli epiteelin alakerroksessa aivan epiteelin juuressa, eli proteiini C:n esiintymisalueella ohutsuolen ulkokerroksessa (Protein Atlas). Kuvassa 3 on esitetty oranssilla vasta-aine C:n teorettinen sijaintialue ohutsuolen pinnalla.



KUVA 3. Vasta-aine C:n oletettu sitoutumiskohta ohutsuolen pintakerroksessa (Kuva: Katri Lindfors & Nelli Koivula 2018)

Vasta-aine C (ThermoFisher) oli valmistettu kanissa ja valmistajan ilmoittama konsentraatio oli  $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ . Vasta-aine oli polyklonaalinen ja ei-konjugoitu. Sitä säilytettiin pakastimessa ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) jaettuna useampaan  $20 \text{ }\mu\text{l}$ :n osaan alkuperäisestä  $100 \text{ }\mu\text{l}$ :sta.

### 3.4.1 Vasta-aine C:n ensimmäinen kokeiltu protokolla

Vasta-aine C:n ensimmäinen kokeiltu protokolla tehtiin kahdella objektilasilla, joista ensimmäisellä oli potilaiden 45 ja 51 leikkeet ja toisella lasilla oli kontrolli kolmen (k3) leike. Protokolla aloitettiin leikkeiden parafiinin poistolla, kuten kahdessa muussakin vasta-aineessa. Ksyleenin ja laskevan alkoholisarjan jälkeen lasit upotettiin kiehuvaan sitraattipuskuriin, jotta löydettiin oikea epitooppi. Puskuri oli sama kuin A vasta-aineessa. Laseja pidettiin kiehvassa puskurissa 30 minuuttia, jonka jälkeen niitä jäähdytettiin samassa puskurissa 20 minuuttia. Jäähdytyksen jälkeen lasit pestiin PBS-liuoksella kaksi kertaa viisi minuuttia.

Endogeenisen peroksidaasin blokkaukseen suoritettiin PBS-liuoksessa, johon oli lisätty  $0,3 \%$ :a vetyperoksidia. Blokkaukseen kesti 30 minuuttia. Blokkauksen jälkeen laseille annosteltiin ei-spesifisen värjäytymisen estävä valmis kaupallinen liuos, ImmPRESS rabbit-Ig – reagenssi (Vector Labs). ImmPRESS-reagenssilla laseja inkuboitettiin huoneenlämmössä 20 minuuttia kosteassa kammiossa.

Primaarivasta-aine laimennettiin 1:150 ja laimennusliuoksena oli 0,1 % BSA-PBS. Vasta-ainelaimennosta pipetoitiin jokaisen leikkeen päälle 30 µl:aa. Vasta-aineen inkubaatio kesti yön yli seuraavaan päivään. Inkubointi tapahtui kosteassa kammiossa jääkaapissa (4 °C). Primaarivasta-aineen jälkeen lasit pestiin PBS-liuoksella viiden minuutin ajan. Pesun jälkeen lasseille annosteltiin ImmPRESS-peroksidaasireagenssi (Vector Labs), jonka kanssa laseja inkuboitiin 30 minuuttia. Tämän jälkeen leikkeet värjättiin loppuun kuten kahdessa muussakin protokollassa.

### **3.4.2 Vasta-aine C:n kokeillut muutokset ja optimoitu protokolla**

Vasta-aine C:n toisessa kokeilussa protokollassa toimittiin muuten samoin kuin ensimmäisessä, mutta PBS pesuihin lisättiin mukaan 0,1 % Triton X-100. Protokollaan lisättiin myös yksi viiden minuutin pesu endogeenisen peroksidaasin blokkauksen ja ei-spesifisen värjäytymisen estämisen välille. Primaarivasta-aineen laimennos pysyi samana. Kokeilu suoritettiin kahdella objektilasilla, joissa oli samojen potilaiden leikkeet ja kontrollit kuin ensimmäisessä kokeilussa.

Vasta-aine C:n kolmas kokeiltu protokolla oli samanlainen kuin toinen, vain vasta-aineen laimennosta muutettiin. Se oli 1:300. Objektilaseilla, joita kokeilussa käytettiin, olivat potilaiden 60 ja 62 leikkeet sekä kontrolli kuuden (k6) leike.

Vasta-aine C:n neljännessä kokeilussa primaarivasta-aineen laimennos oli 1:500. Protokolla pysyi muuten samana kuin kolmas kokeilu. Kokeilu suoritettiin kolmella objektilasilla, joista kahdella oli neljä leikettä (potilaista 1, 2, 6 ja 8) ja yhdellä oli leike kontrolli 44D2.

Vasta-aine C:n viidennessä kokeilussa vasta-aineen laimennos pysyi samana, mutta laimennusliuosta vaihdettiin. Laimennusliuoksena oli 2 % hevosen normaalseerumi BSA-TBST. TBS-kantaliuoksen valmistusohjeet ovat liitteessä 1. TBS-kantaliuoksen pH säädettiin 7,6:een suolahapolla. Siitä valmistettiin BSA-TBST-liuos laimentamalla 1:10 eli 10 ml:a kantaliuosta 100 ml:n mittapulloon. Siihen lisättiin 100 µl:a Tween20 (0,1 %) ja 1 g BSA-jauhetta (1 %). Tällä liuoksella valmistettiin 2 % hevosen normaalseerumi laimentamalla 12 µl:a hevosen normaalseerumia 588 µl:an BSA-TBST:a. Kokeilu suoritettiin kahdella objektilasilla, joista molemmilla olivat potilaiden 1, 2, 6 ja 8 leikkeet.

Vasta-aine C:n kuudennessa kokeilussa protokollassa primaarivasta-aineen laimennoksina olivat 1:500 ja 1:700. Kokeilu suoritettiin kahdella objektilasilla, joissa molemmissa olivat potilaiden 1, 2, 6 ja 8 leikkeet. Kokeilu tehtiin noudattaen vasta-aine B:n lopullista protokollaa, vain primaarivasta-aineen laimennokset olivat laimeammat.

Vasta-aine C:n lopullinen protokolla oli sama kuin vasta-aine B:n lopullinen protokolla. Vasta-aineen laimennos oli 1:700. Lopullinen sarja värjättiin kolmessa osassa, joista jokaisessa oli kahdeksan objektilasia.

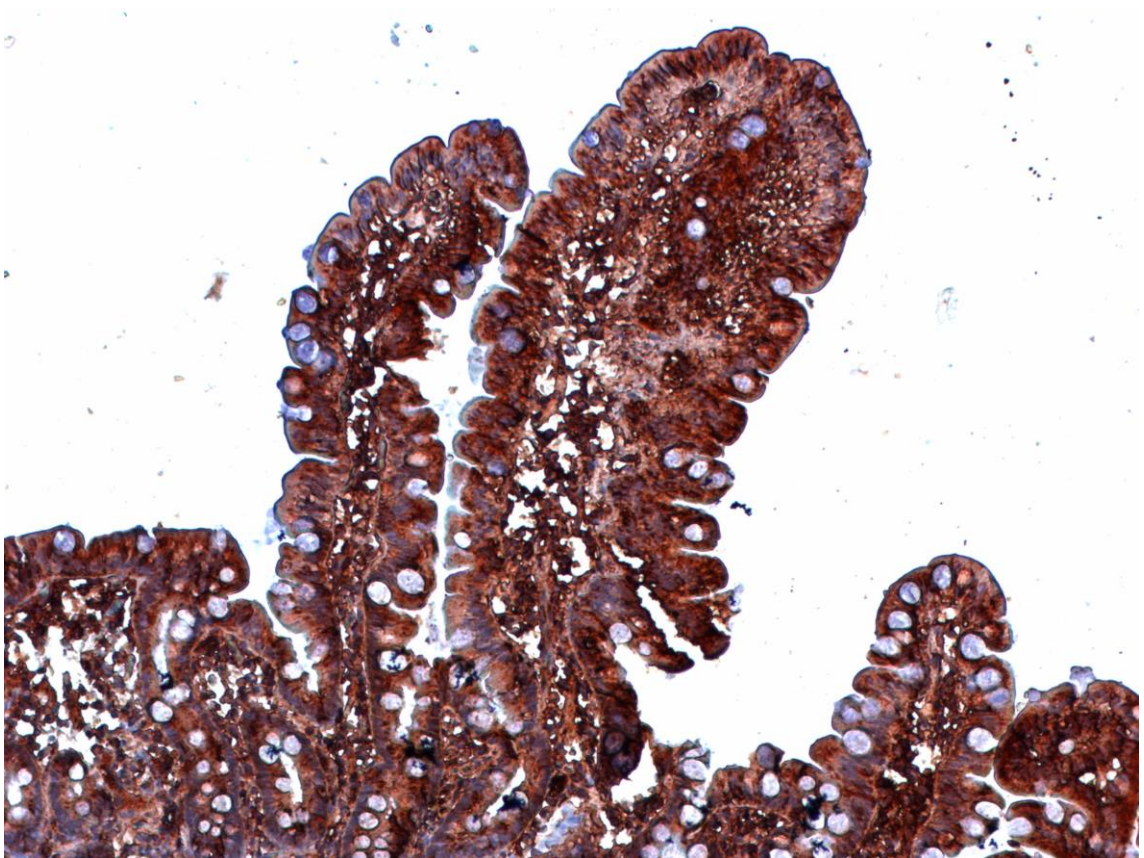
### **3.5 Mikroskopiointi**

Leikkeiden tutkimiseen käytetty mikroskooppi oli Olympus BX60 ja leikkeitä kuvattiin Cell D Soft imaging system – ohjelmalla. Ohjelman väriasetukset, joilla leikkeet kuvattiin, olivat: punainen 1,35; vihreä 1,00; sininen 2,82; gamma 1,00 ja värikylläisyys (saturation) 0,20. Valotusasetuksia säädettiin sopivaksi jokaiselle leikkeelle, mutta yleensä valotusaika vaihteli 20 – 160 ms. Mikroskoopin objektiivi oli kymmenkertainen (10x). Kaikki värjäykset mikroskoipoitiin ja kuvattiin mahdollisimman pian värjäyksen jälkeen mahdollisten haalistumien ja muuntumien estämiseksi.

## 4 TULOKSET

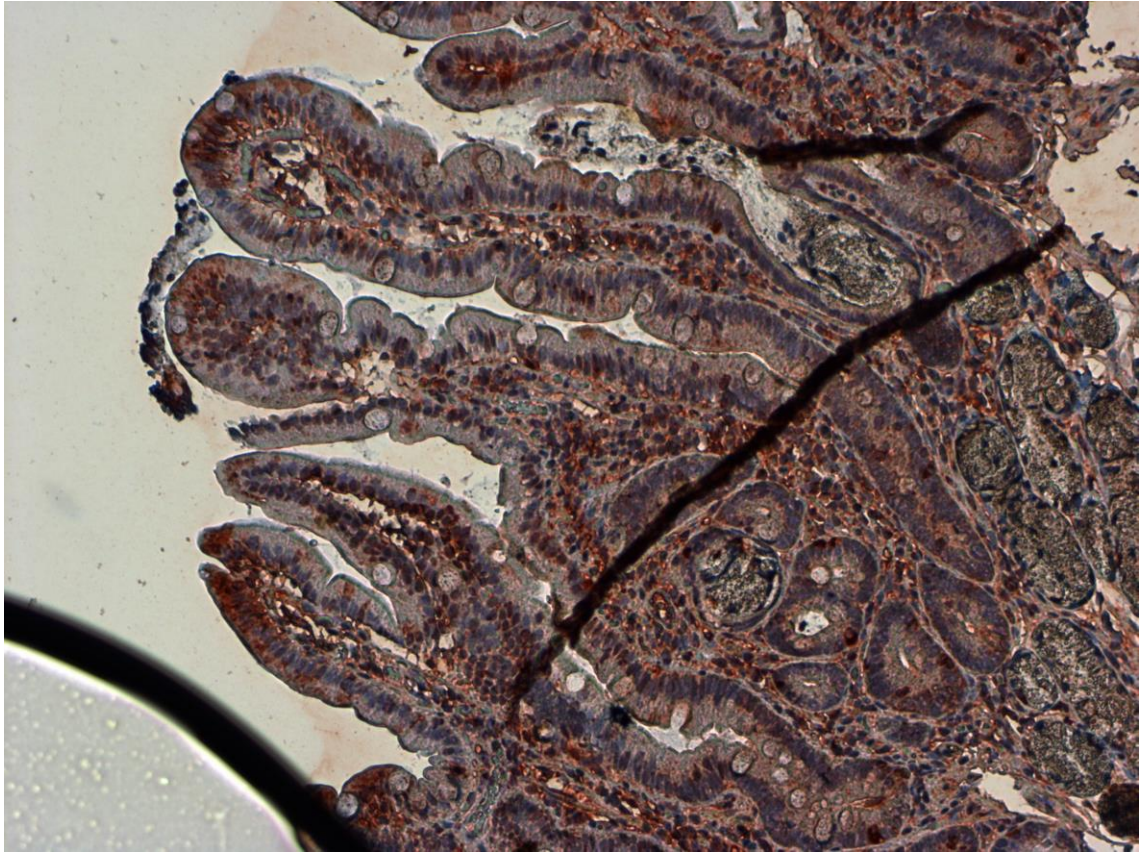
### 4.1 Vasta-aine A:n kokeiluvaiheen tuloksia

Vasta-aine A:n ensimmäisessä kokeilussa värjäytyvyys oli liiallista. Vasta-aineen aiheuttamaa punaista väriä oli muuallakin leikkeissä kuin epiteelin alapinnalla, aiheuttaen leikkeisiin kauttaaltaan punaisen värin. Kuvassa 4 nähdään yhden kokeilussa mukana olleen potilaan (potilas 29) leike. Leikkeen kuvasta on vaikea sanoa missä siinä on tarkka tulos, koska koko leike on värisävyltään liian tummanpunainen.



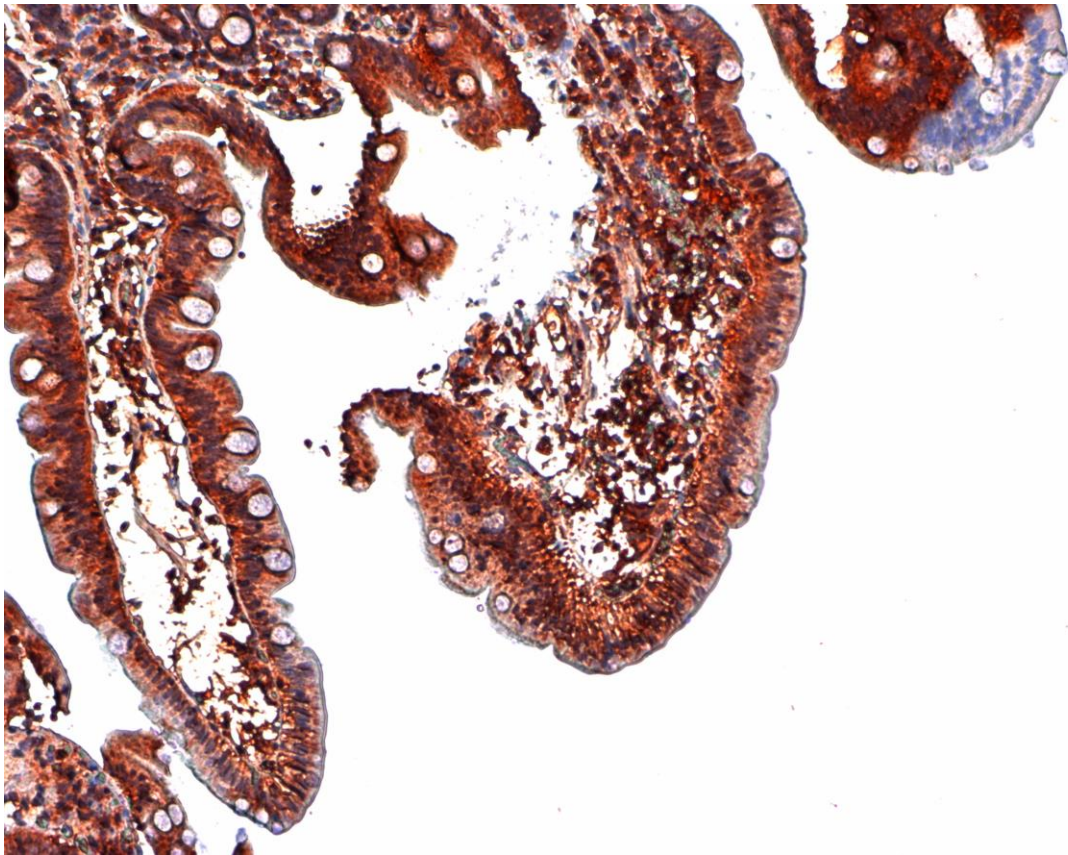
KUVA 4. Vasta-aine A:n ensimmäinen kokeiltu protokolla, potilas 29

A:n toisessa kokeilussa protokollassa tulokset olivat paremmat kuin ensimmäisessä kokeilussa. Ylimääräinen värjäytyvyys oli vähentynyt, koska pesuihin lisättiin Triton X-100 mukaan. Kuvassa 5 nähdään yksi leike (kontrolli kuusi) kokeilusta kaksi. Siinä punaista vasta-aineen aiheuttamaa väriä on toivotulla paikalla epiteelin alapinnalla, mutta värin tummuus on liiallinen.



KUVA 5. Vasta-aine A:n toinen kokeiltu protokolla, kontrolli kuusi (k6)

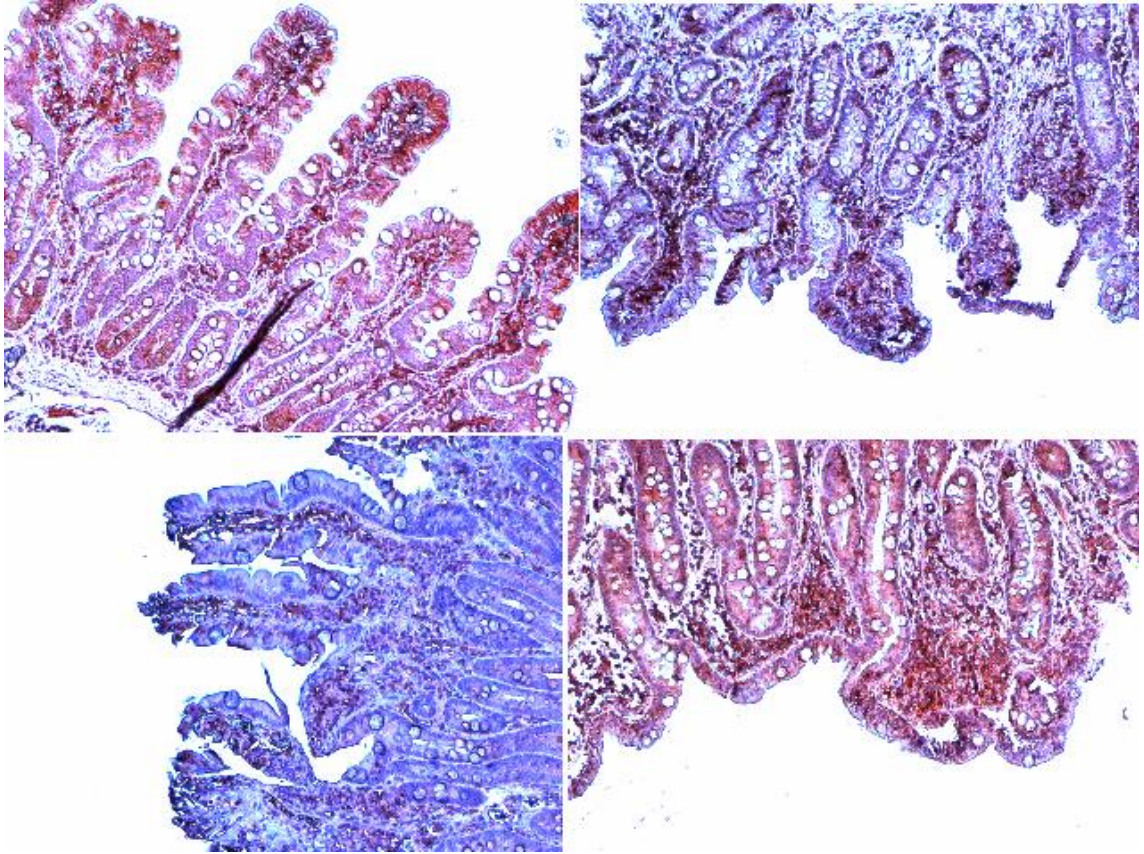
Vasta-aine A:n kolmannessa kokeilussa värjäytyvyys oli vähentynyt ja haluttu värin sijainti pystyttiin toteamaan. Kuvassa 6 nähdään leike kontrolli 130B. Kolmannen kokeilun leikkeissä värjäytyvyys oli sopivan tummaa (punaisen eri syvyydet olivat erotettavissa) ja vasta-aineen aikaansaamaa punaista leimaa oli epiteelin alapinnalla.



KUVA 6. Vasta-aine A:n kolmas kokeiltu protokolla, kontrolli 130B

#### 4.2 Vasta-aine A:n optimoidun protokollan tulokset

Vasta-aine A:n optimoidulla protokollalla saatiin värjättyä koko potilassarja. Värjätty leikkeet olivat värjäytyneet samoin kuin kolmannen kokeilun mukaan niiden pitikin värjättyä. Värjätyissä leikkeissä vaihteli punaisen värin syvyys ja määrä, mikä todennäköisesti johtuu potilasnäytteiden eroista ja oli tavoiteltu tulos. Kuvassa 7 on esimerkkejä potilassarjan leikkeiden värjäytymisestä. Optimoidussa protokollassa vasta-aineen aiheuttama punainen väri oli epiteelin alapinnalla.

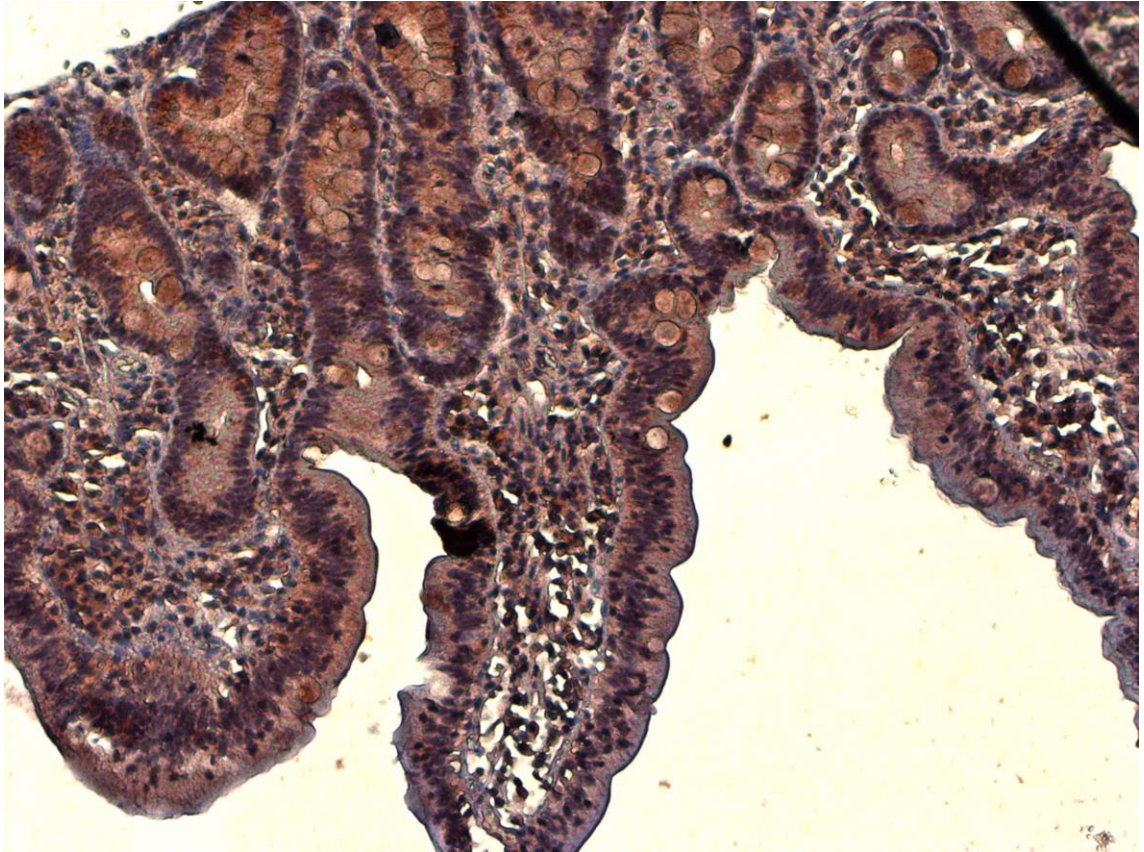


KUVA 7. Vasta-aine A:n esimerkkejä potilassarjan leikkeiden värjäytymisestä

#### 4.3 Vasta-aine B:n kokeiltujen protokollien tulokset

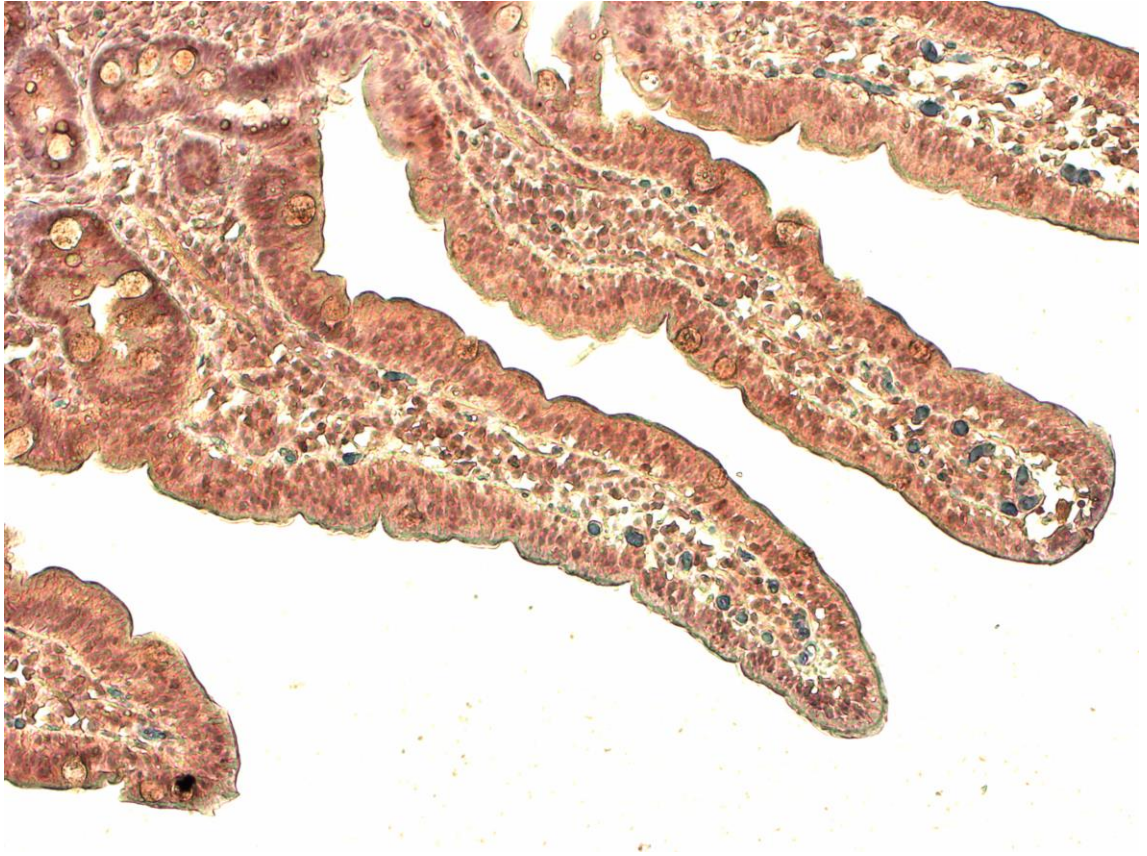
Vasta-aine B:n ensimmäisessä kokeilussa punainen värjäytyvyys oli vaaleaa ja sitä oli koko leikkeellä. Kuvassa 8 nähdään kontrolli neljän leike (k4), joka oli mukana B:n ensimmäisessä kokeilussa. Leikkeeltä oli vaikea havainnoida, missä siinä oli haluttu vasta-aineen aiheuttama punainen väri. Epiteelin yläosa vaikutti olevan kokonaan ilman haluttua sävyä.





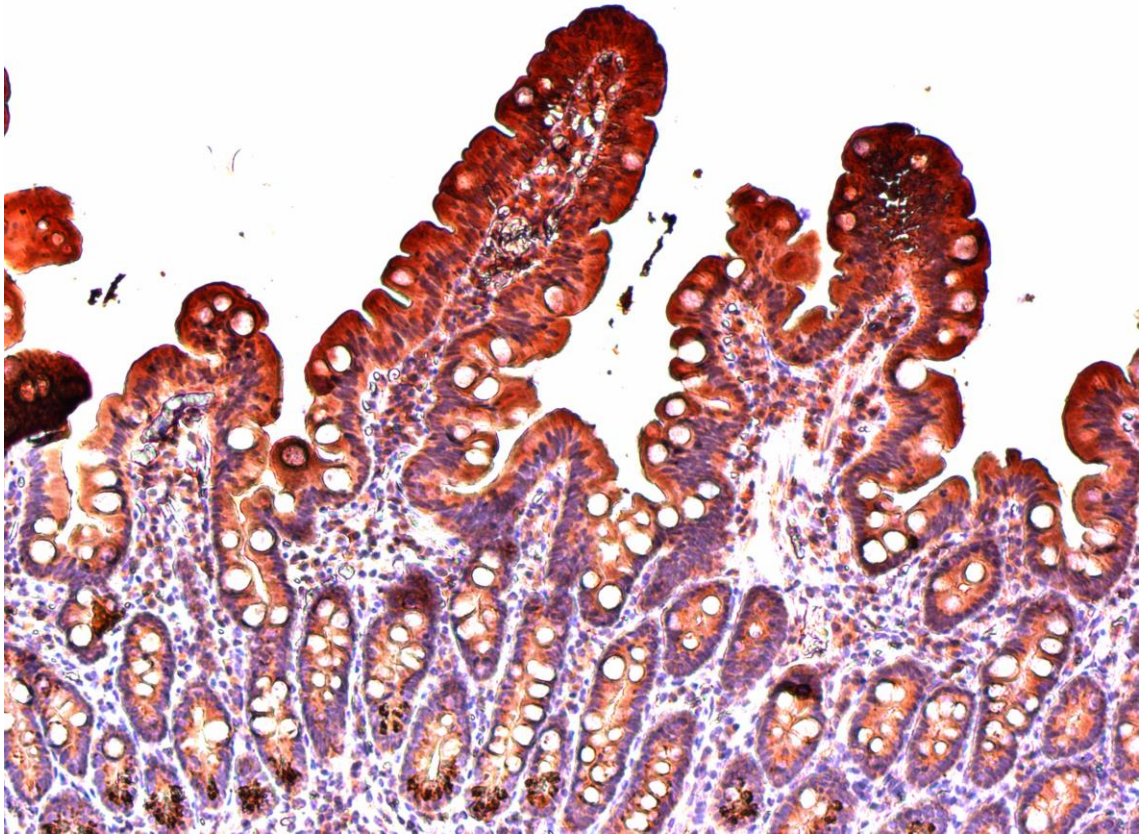
KUVA 8. Vasta-aine B:n ensimmäinen kokeilu protokolla, kontrolli neljä (k4)

Kuvassa 9 on yksi leike (k4), joka oli mukana B:n toisessa kokeilussa, ja siitä voidaan havaita värjäytyvyyden olevan liiallista ja hankalasti tulkittavissa. Leikkeessä punaista väriä on kaikkialla, mutta epiteelin yläosa vaikutti olevan ilman haluttua väriä. Toisen kokeilun muutkin leikkeet antoivat vastaavia tuloksia.



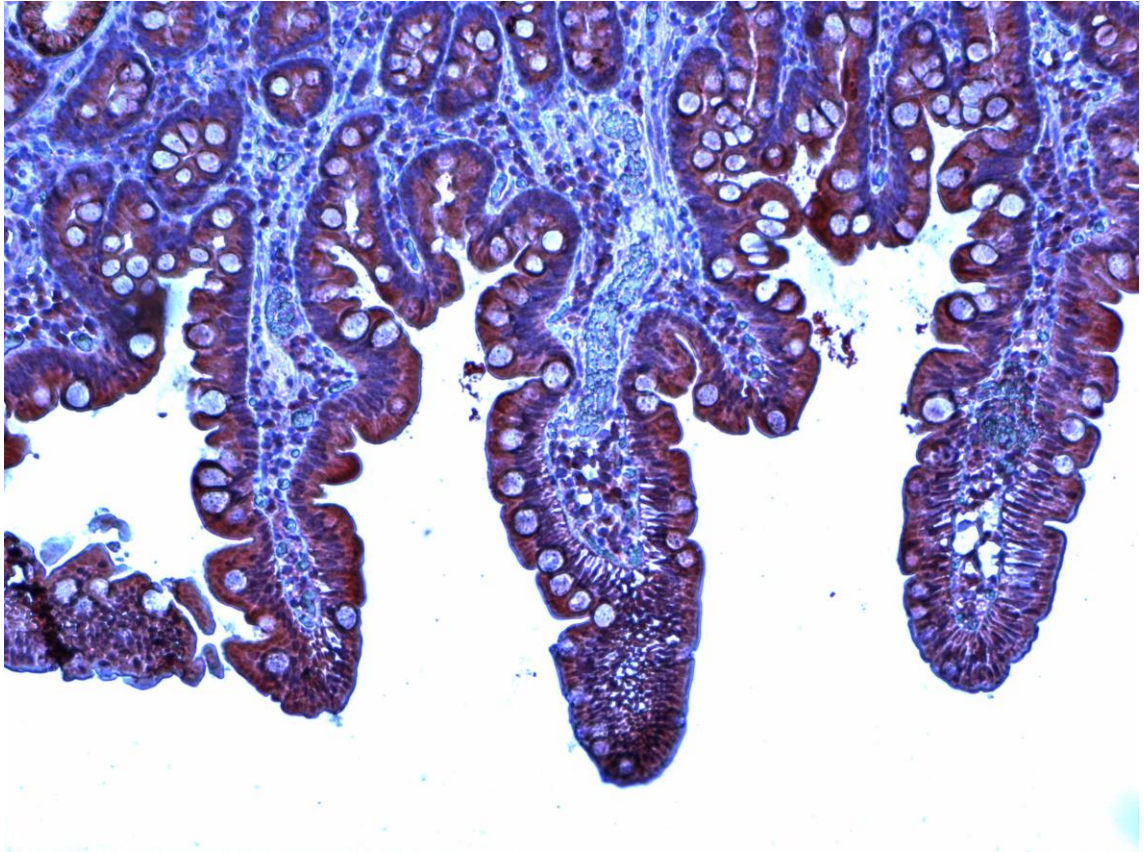
KUVA 9. Vasta-aine B:n toinen kokeiltu protokolla, kontrolli neljä (k4)

Kuvassa 10 on vasta-aine B:n kolmannen kokeilun yksi leike (potilas 1). Leikkeestä on havaittavissa tavoiteltu tulos, eli punainen väri on löytänyt spesifisen sitoutumiskohtansa ja väriä ei ole koko leikkeessä. Kuitenkin värin tummuus oikeilla kohdilla on liiallista, eli värisävy on liian syvä.



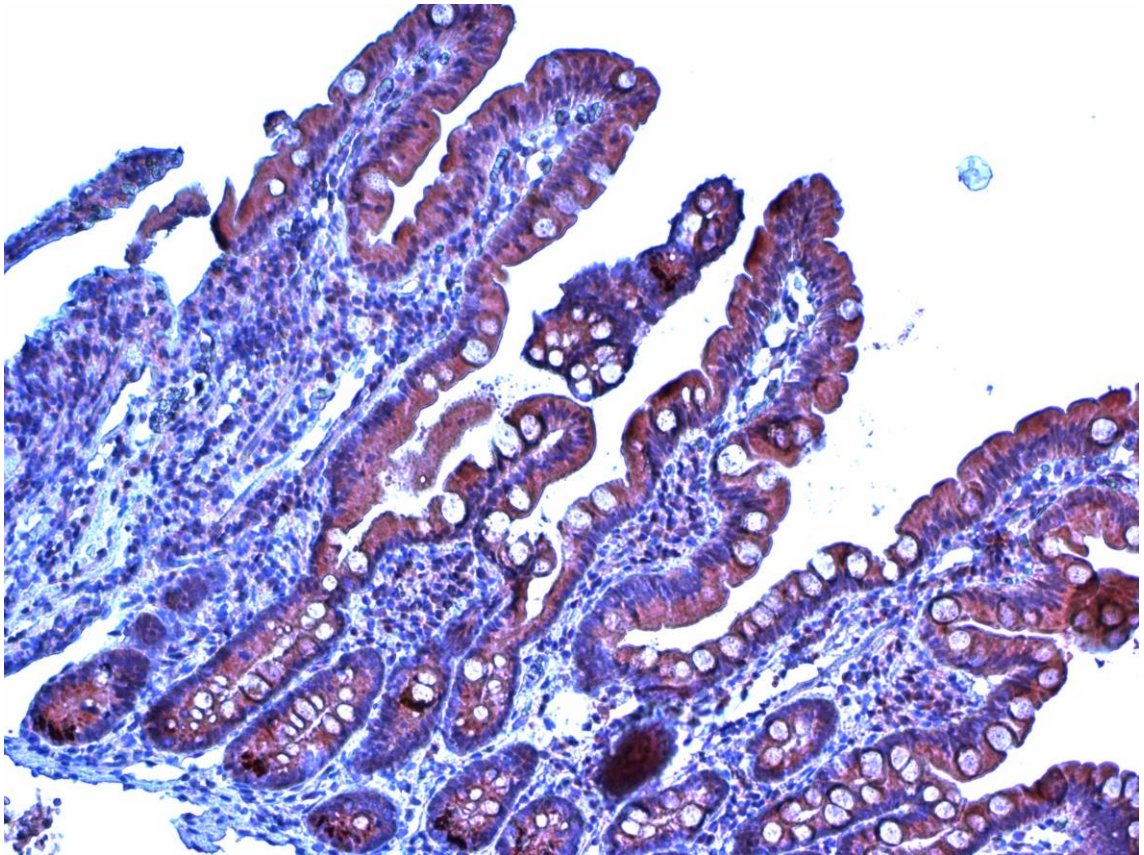
KUVA 10. Vasta-aine B:n kolmas kokeiltu protokolla, potilas 1

Kuvassa 11 nähdään B:n neljänteen kokeiluun käytetty leike (potilas 1), jossa primaari-vasta-aine oli laimennettu 1:100. Värjäytyvyys on hyvällä paikalla epiteelin ulkoreunassa, mutta punainen väri on liian tumma.



KUVA 11. Vasta-aine B:n neljäs kokeiltu protokolla, laimennos 1:100, potilas 1

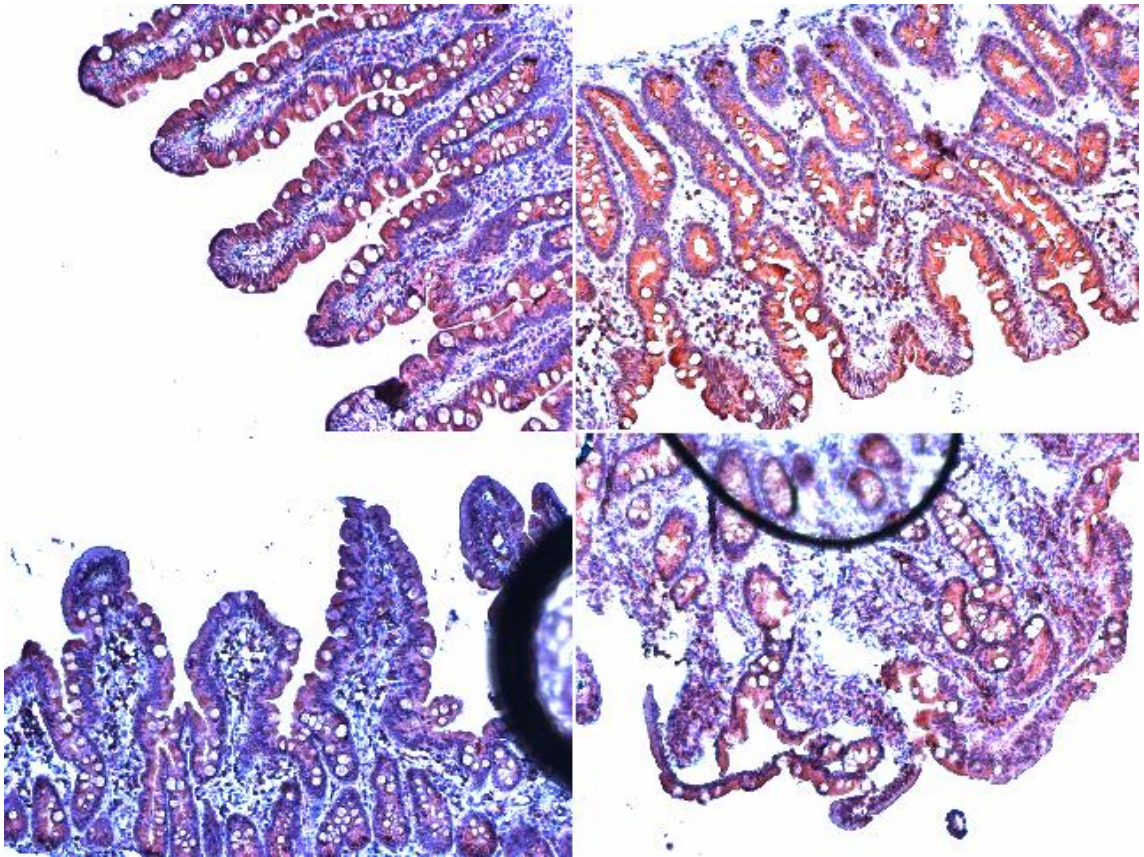
Kuvassa 12 on B:n neljännen kokeilun leike (potilas 1), jossa primaarivasta-aine oli laimennettu 1:150. Kuvasta nähdään punaisen värin olevan oikealla paikalla kuten 1:100 laimennoksellakin, ja punainen väri on riittävän vaalea oikean signaalin havainnoimiseksi.



KUVA 12. Vasta-aine B:n neljäs kokeiltu protokolla, laimennos 1:150, potilas 1

#### 4.4 Vasta-aine B:n optimoidun protokollan tulokset

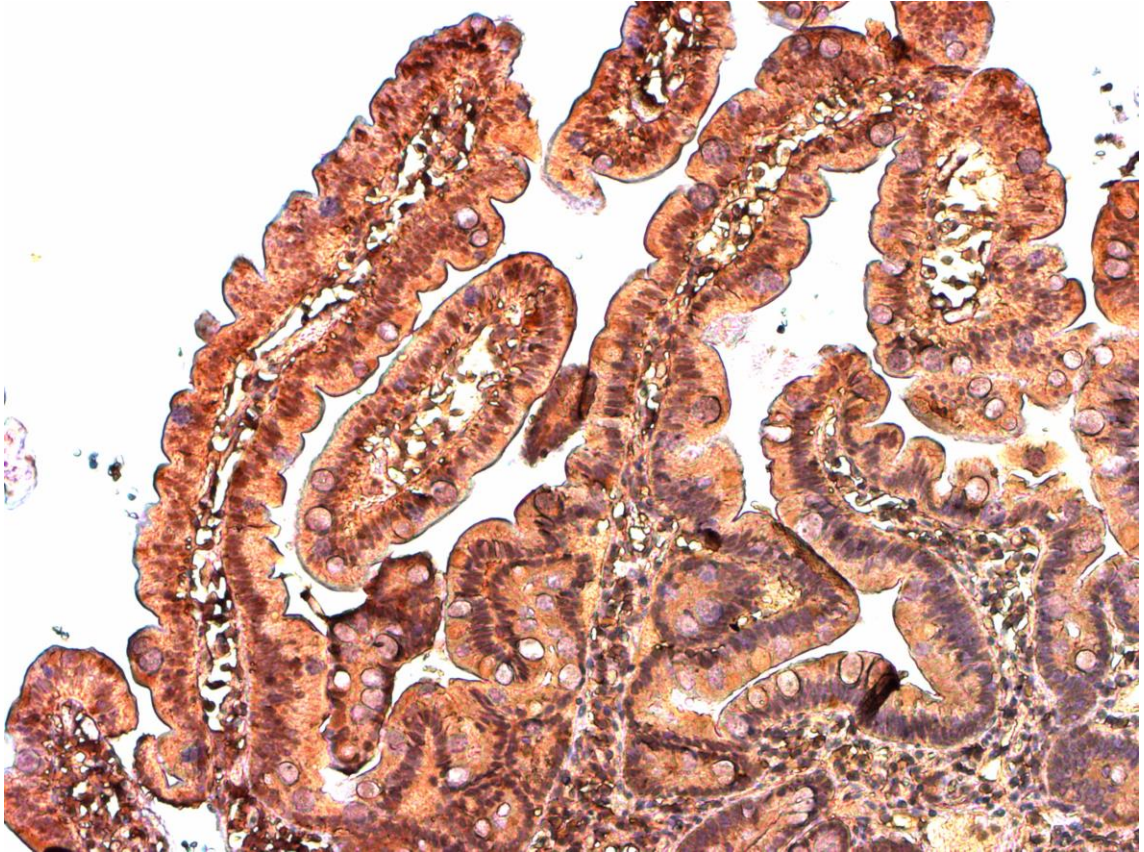
Vasta-aine B:n optimoidulla protokollalla värjätyt potilassarjan leikkeet saatiin värjättyä toivotulla tavalla ja neljännen kokeilun värjäytymistuloksia noudattaen. Kuvassa 13 on muutamia esimerkkejä optimoidun värjäyksen tuloksista. Optimoidussa värjäyksessä punainen väri sijoittui toivotusti epiteelin ulkoreunaan ja sen eri sävyistä pystytään havainnoimaan potilaiden yksilölliset erot.



KUVA 13. Vasta-aine B:n optimoidun värjäyksen esimerkkituloksia

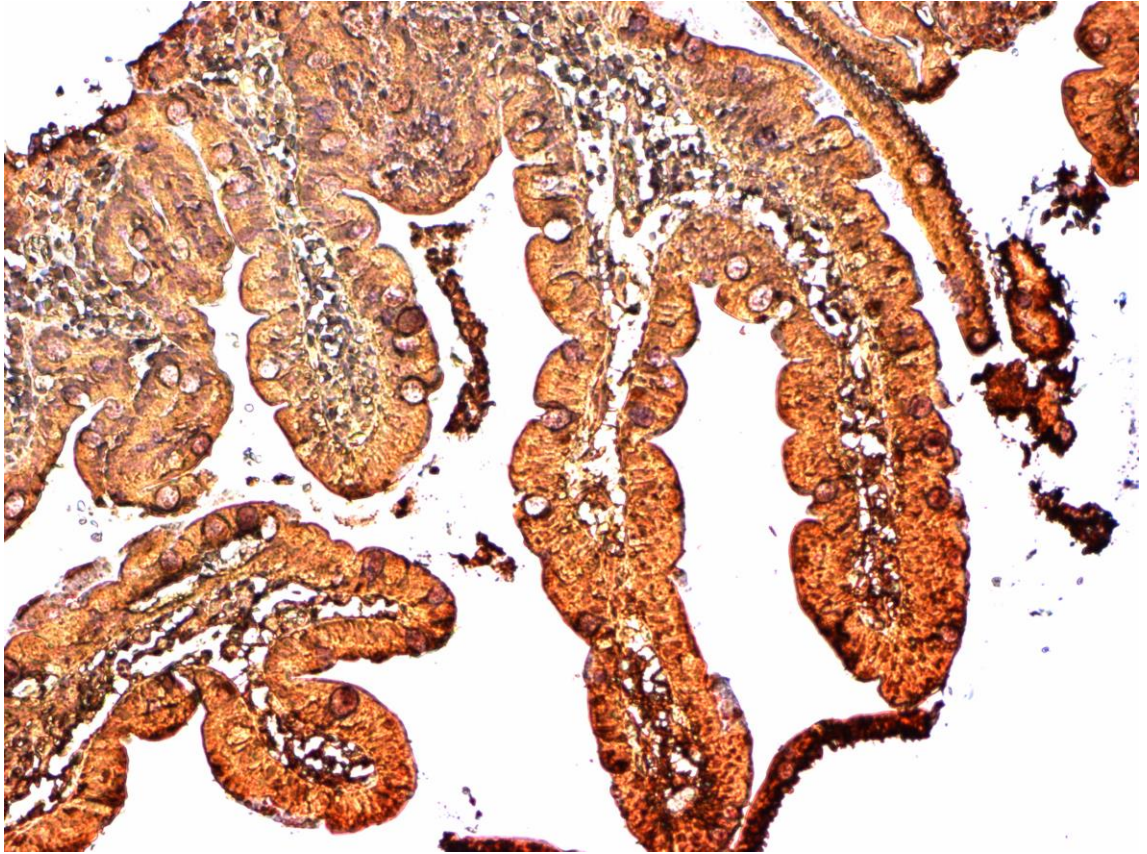
#### 4.5 Vasta-aine C:n välitulokset

Kuvassa 14 nähdään yksi vasta-aine C:n ensimmäisen kokeilun leikkeistä (k3). Leikkeessä punainen väri on syvemmän värinen toivotuista kohdista (epiteelin alapinnalta), mutta kaikkialla oleva punertavuus leikkeessä haittaa oikean tuloksen varmistamista.



KUVA 14. Vasta-aine C:n ensimmäinen kokeiltu protokolla, kontrolli kolme (k3)

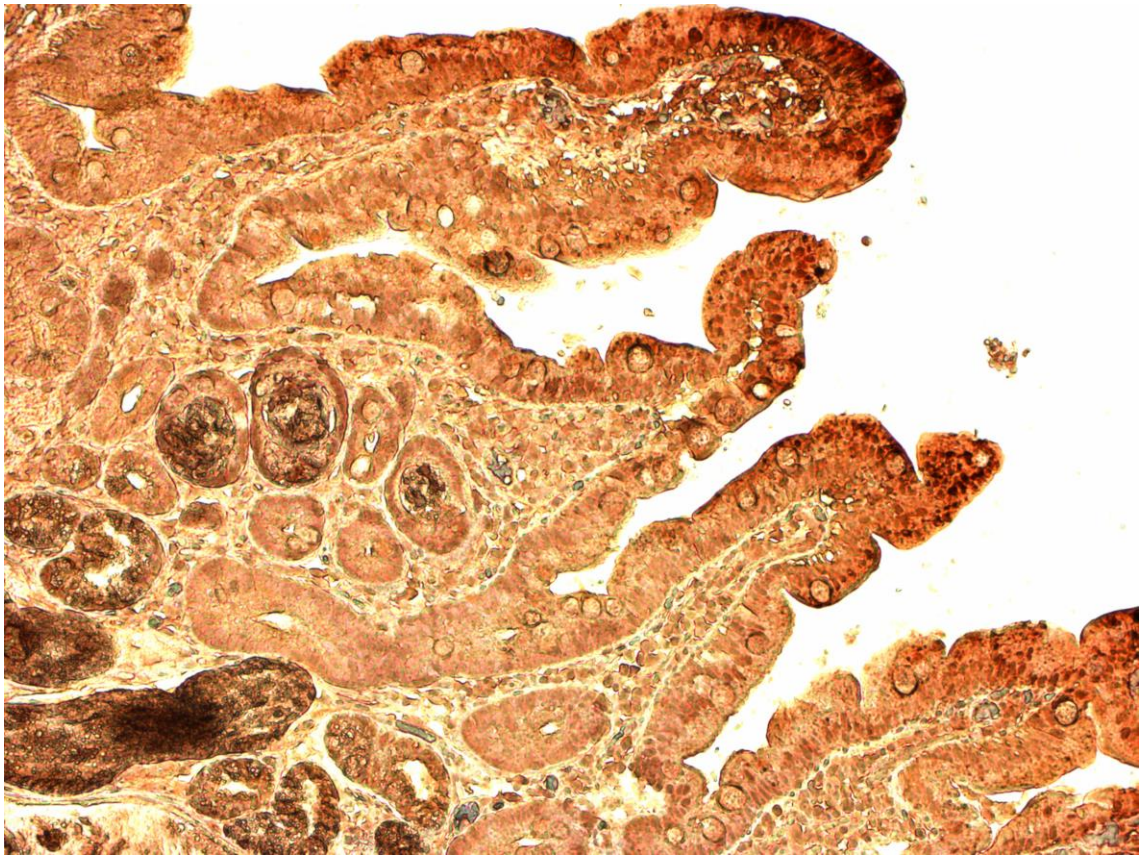
Kuvassa 15 nähdään C:n toisen kokeilun tuloksista yksi leike (k3). Leike värjäytyi tehdyistä muutoksista huolimatta edelleen liian punaiseksi ja spesifistä värjäytymistä on hankala havaita.



KUVA 15. Vasta-aine C:n toinen kokeiltu protokolla, kontrolli kolme (k3)

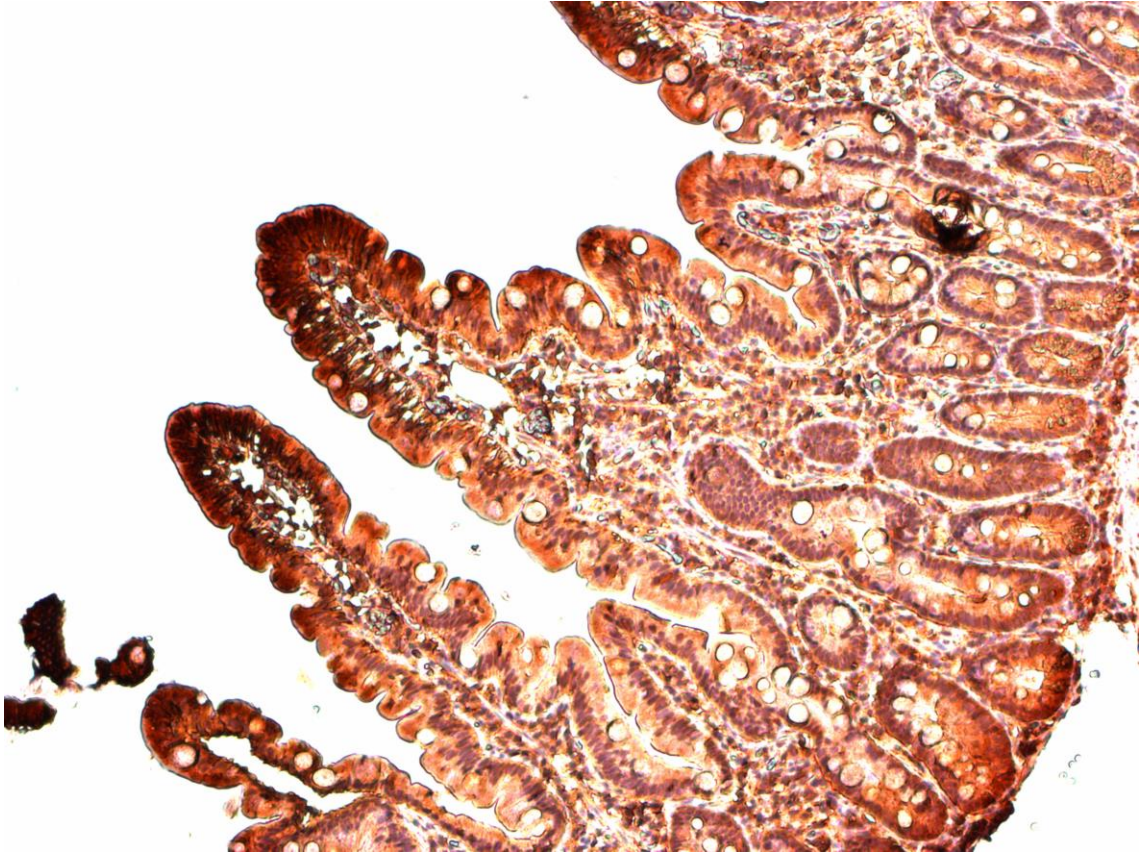
Kuvassa 16 on C:n kolmannen kokeilun yksi mukana olleista leikkeistä (k6). Spesifistä värjäytymistä epiteelin alakerroksesta on vaikea erottaa, koska koko leike on punainen. Kokeillusta protokollasta oli mahdotonta arvioida värjäsiikö se leikkeen tavoitellusta kohdasta liiallisen värjäytymisen takia.





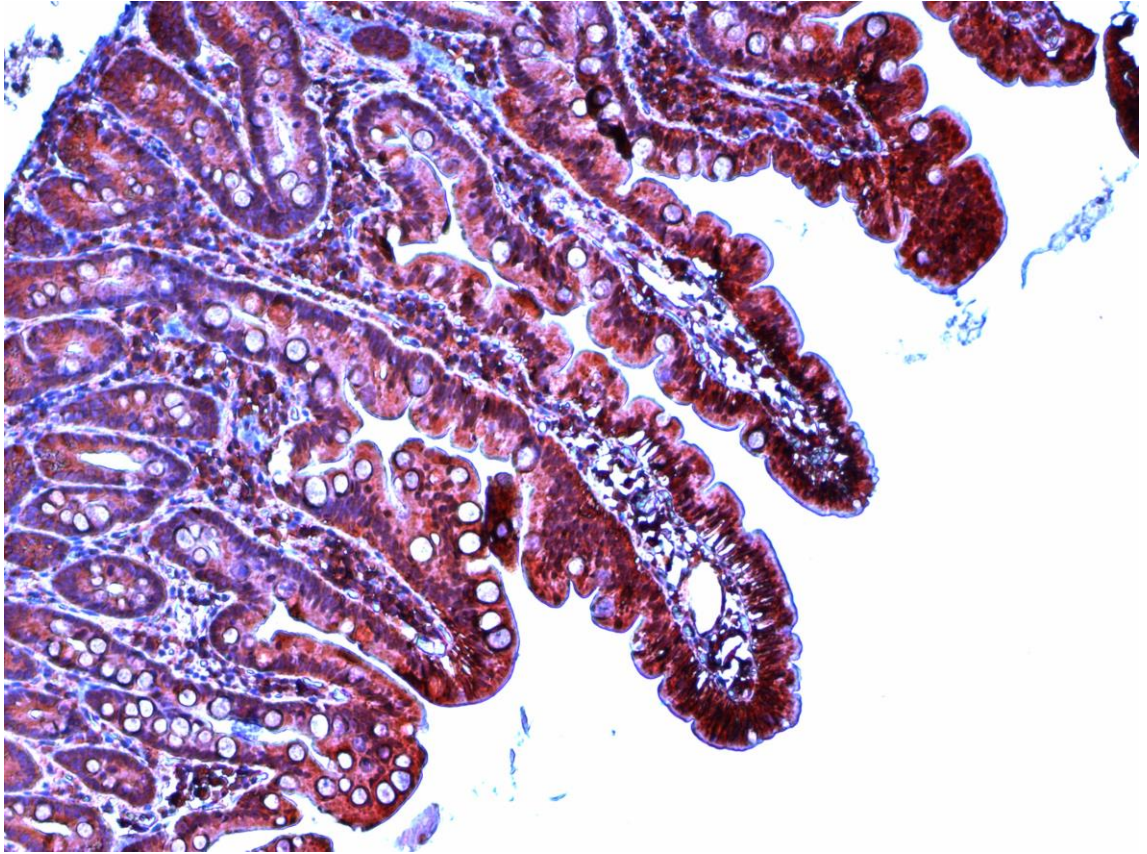
KUVA 16. Vasta-aine C:n kolmas kokeiltu protokolla, kontrolli kuusi (k6)

Kuvassa 17 nähdään C:n neljännen kokeilun yksi leike, potilas yksi. Punainen väri on todella tumma ja vasta-aineen sijoittumispaikkaa leikkeessä on hankala arvioida. Punaista väriä näytti olevan sekä epiteelin yläosassa että alaosassa.



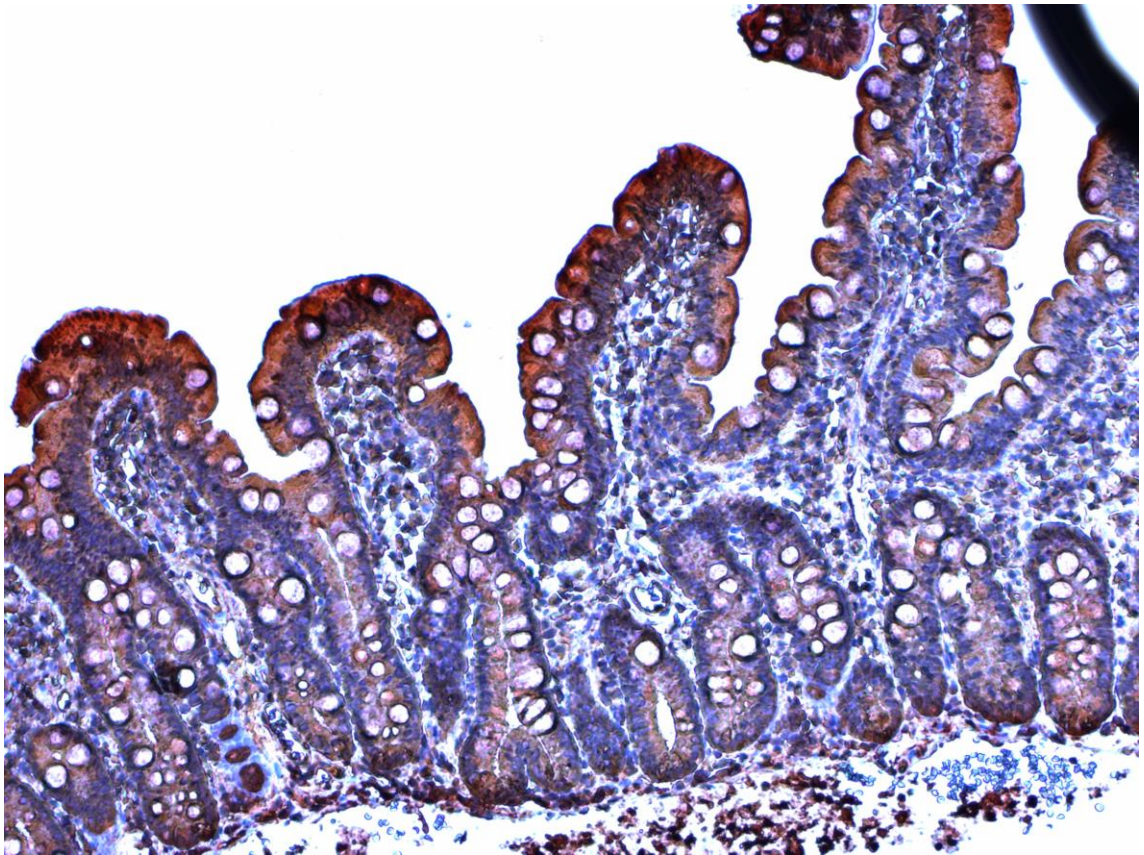
KUVA 17. Vasta-aine C:n neljäs kokeiltu protokolla, potilas 1

Vasta-aine C:n viidennessä kokeilussa ollut leike, potilas 1, on kuvassa 18. Siinä vasta-aineen punaisen värin paikka ei ollut tarkasti sijoittunut, vaikkakin epiteelin alaosassa näytti olevan hieman punaista väriä. Leikkeen koko epiteelikerros värjäytyi todella tummaksi.



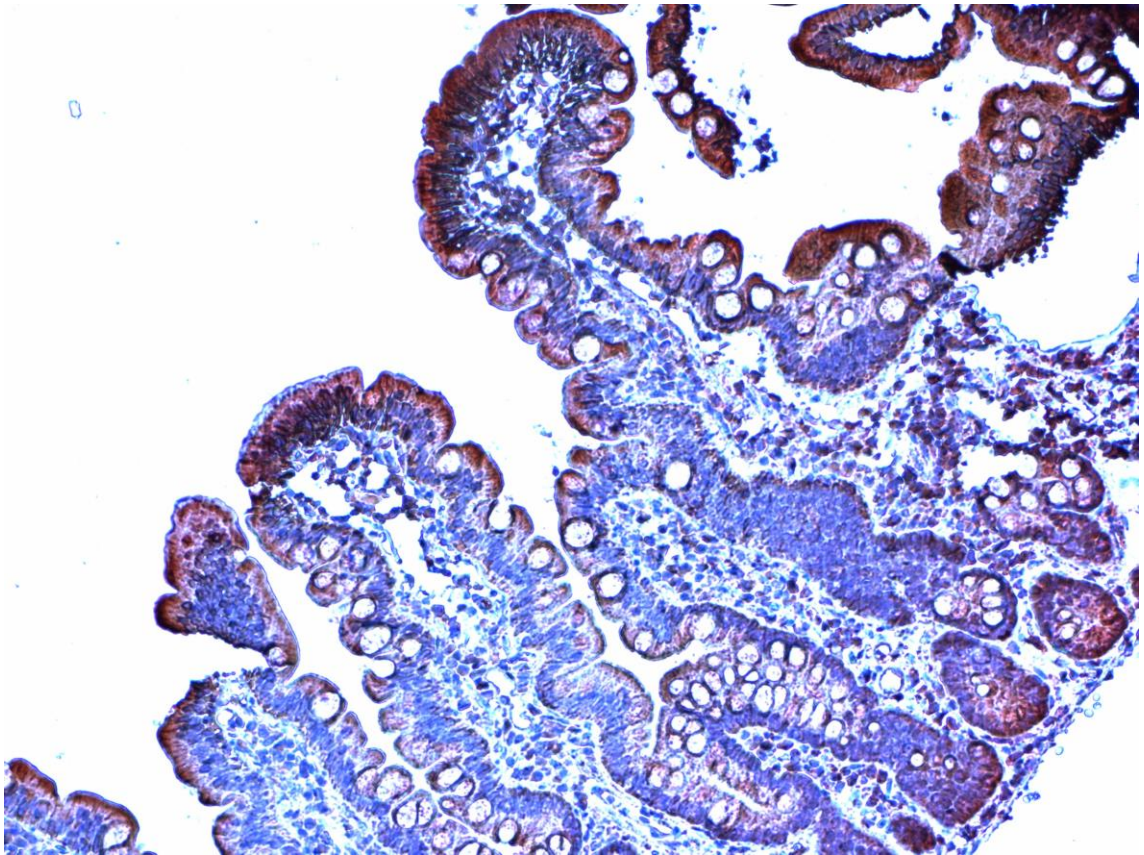
KUVA 18. Vasta-aine C:n viides kokeiltu protokolla, potilas 1

Vasta-aine C:n kuudennen kokeilun yksi leike, potilas kahdeksan, on kuvassa 19. Kokeilussa primaarivasta-aineen laimennos oli 1:500. Punaisen värin paikka oli tarkka, vaikkakin teoriasta hieman poikkeava, koska punaista väriä oli myös epiteelin yläosassa eikä vain alaosassa. Kokeilussa kuitenkin värin tummuus oli liiallista.



KUVA 19. Vasta-aine C:n kuudes kokeiltu protokolla, laimennos 1:500, potilas 8

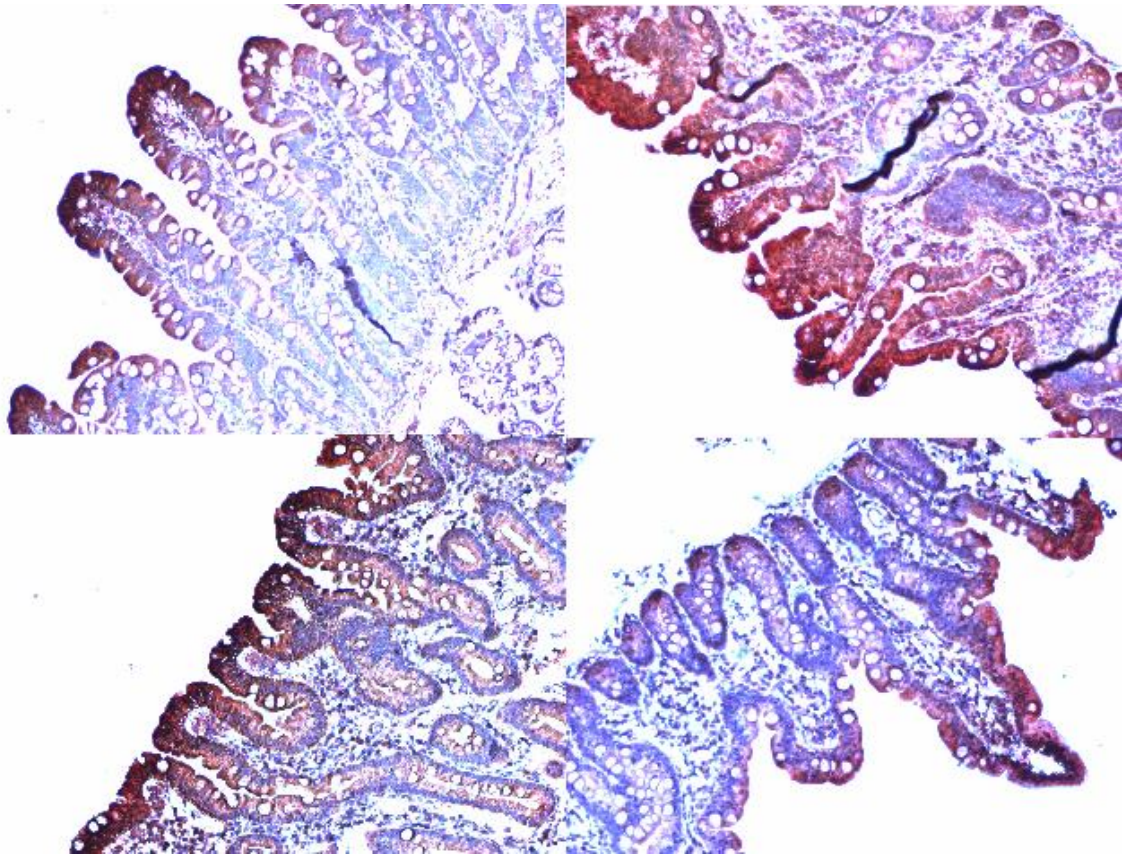
Kuvassa 20 on C:n kuudennen kokeilun leike (potilas 8), jossa primaarivasta-aineen laimennos oli 1:700. Punainen väri sijoittui molempiin epiteelin ylä- ja alaosaan, mikä poikkesi hieman teorian oletuksesta, mutta toistoilla todettu sijoittuminen näin hyväksyttiin. Vasta-ainelaimennoksella 1:700 punaisen värin tummuus oli hyvä.



KUVA 20. Vasta-aine C:n kuudes kokeiltu protokolla, laimennos 1:700, potilas 8

#### **4.6 Vasta-aine C:n optimoidun protokollan tulokset**

Vasta-aine C:n optimoidulla protokollalla saatiin värjättyä koko näytesarja. Lopullisten värjäytymisten tulokset olivat vastaavat kuin C:n kuudennen kokeilun. Kuvassa 21 on esimerkkikuvia näytesarjan värjäyksistä. Vasta-aine C:n optimoitujen värjäysten tulokset poikkesivat tavoitellusta teoreettisesta tuloksesta, koska vasta-aine sitoutui epiteelin yläosaan eikä vain alaosaan, antaen tumman punaisen värin.



KUVA 21. Vasta-aine C:n esimerkkikuvia optimoidusta näytesarjan värjäyksestä

## 5 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoite ja tarkoitus toteutuivat. Kaikille kolmelle vasta-aineelle saatiin optimoitua protokollat ja värjättyä täydet näytesarjat optimoiduilla protokollilla. Protokollat todettiin optimoiduiksi, kun värjäyskokeiluja oli suoritettu useita ja niistä oli saatu toistuvasti samassa kohdassa sijainnutta vasta-aineen punaista väriä, jonka voimakkuudesta oli erotettavissa eri sävyjä. Proteiinit A ja B sijoittuivat niin kuin teoreettisesti pitikin ohutsuolen pintakerroksessa (Protein Atlas). A värjäytyi epiteelin alapuolelta, eli tummin punainen väri oli havaittavissa epiteelin alaosassa. B värjäytyi villusten kärjistä ja epiteelin yläosista antaen tummimman punaisen värin siellä, missä sen teoreettisesti pitikin olla (Protein Atlas). Proteiini C värjäytyi myös epiteelin yläosista vaikka sen värjäytymisen olisi pitänyt näkyä epiteelin alaosassa (Protein Atlas). Värjäystuloksissa epiteelin alaosassa näkyy myös punaista leimaa, mutta voimakkain väri vaikutti olevan epiteelin yläosassa. Saatu poikkeava värjäytyminen ei tarkoita välttämättä, että protokollassa tai vasta-aineessa olisi ongelma. Saatu tulos voi tarkoittaa, että niillä potilailla, joilta näytteet olivat, proteiini C:tä on myös epiteelin yläosissa.

Kyseessä oli tutkimus, jossa ei ollut tavoiteltuna tuloksena vain yksi oikea ratkaisu. Värjäysprotokollia ei ollut tarkoitus optimoida perustuen vain tiukkaan käsitykseen siitä, missä proteiinin tulisi kudoksessa olla. Tulosten luotettavuus ja optimoinnin onnistuminen perustuivat toistoihin ja arvioon värin sävystä sekä paikasta. Tulosten luotettavuutta voisi arvioida toistamalla optimoiduilla protokollilla värjäykset ja vertailemalla, onko värjäytyvyys syvyydeltään ja sävyltään vastaavaa ja onko sen paikka leikkeessä sama. Toistamisesta hankalaa tekee näytteiden yksilöllisyys, koska jokaisella tutkimuksessa mukana olleella potilaalla oli yksilölliset taudin oireet ja seuraukset.

Kokeiluissa ongelmina olivat muun muassa halutun punaisen värin tummuus ja värin (vasta-aineen) sitoutuminen kudoksessa muuallekin kuin tavoiteltuun kohtaan. Värin sijaintia muuallakin kuin tavoitellussa kohdassa ei voitu myöskään pitää automaattisesti virheellisenä värjäytymisenä, sillä oli olemassa vain oletus, mihin vasta-aineet kiinnittyvät. Tämän seurauksena tuloksen tulkinta, miten ja missä proteiinia kudoksessa on, vaikeutui.

Kokeiluja tehdessä värjäytymiseen liittyvät ongelmat johtuivat monista syistä. Esimerkiksi tavoitellun värjäytymisen tummuusasteeseen vaikuttivat eniten käytetyt vasta-ainelaimennospitoisuudet. Tummuus olisi voinut johtua myös liian pitkästä inkubaatioajasta tai lämpötilasta kyseisille vasta-aineille (Immunochemical staining methods, 2001, 13). Ei-spesifistä värjäytymistä pyrittiin poistamaan vaihtamalla käytetty epitoopin paljastuspuskuri toiseksi vasta-aineilla B ja C. Puskurin vaihdoksen jälkeen värjäytyminen näytti tarkemmalta ja enemmän siltä, jota tavoiteltiin. Ensimmäisenä käytetty puskuri on voinut olla väärä kyseiselle epitoopille tai puskurin pH tai keittoaika on voinut olla väärä (Buchwalow & Böcker. 2010. 6.1.1). Taustavärjäytymisen määrää pyrittiin vähentämään lisäämällä pesuihin mukaan Triton X-100, jonka tarkoituksena oli tehostaa pesujen vaikutusta. Pesujen tehostus Triton X-100:lla tehtiin kaikille kolmelle vasta-aineelle.

Optimoituja immunovärjäysten tuloksia ja protokollia tullaan käyttämään Keliakiatutkimuskeskuksen tutkimuksissa ja hyödynnetään osana Marleena Revon väitöskirjatutkimusta. Jatkotutkimuksena kyseisille optimoiduille protokollille voisi suorittaa aiemmin mainitun tarkistuksen niiden toistettavuudesta ja optimoituja protokollia voisi hyödyntää tulevaisuudessa vastaavien immunovärjäysmenetelmien tekemisessä. Optimoiduilla protokollilla voidaan tehdä immunovärjäyksiä tutkien vasta-aineiden A, B ja C esiintymistä kudოსleikkeissä ja hyödyntäen saatuja värjäystuloksia esimerkiksi anemian kliinisessä tutkimuksessa.



## LÄHTEET

Buchwalow, I. & Böcker, W. 2010. Immunohistochemistry. Springer.

<https://www.dawsonera.com/guard/protected/dawson.jsp?name=https://idp2.tamk.fi&dest=http://www.dawsonera.com/depp/reader/protected/external/AbstractView/S9783642046094>

Handbook Immunochemical Staining Methods. Kolmas painos. 2001. California: DAKO Corporation. [http://www.ihcworld.com/\\_books/Dako\\_Handbook.pdf](http://www.ihcworld.com/_books/Dako_Handbook.pdf)

Immunohistochemical Staining Methods. Kuudes painos. 2013. Dako Denmark.

[http://kromat.hu/UserFiles/files/patologia/Dako\\_IHC\\_metodi-kai\\_k%C3%A9zik%C3%B6nyv\\_I.pdf](http://kromat.hu/UserFiles/files/patologia/Dako_IHC_metodi-kai_k%C3%A9zik%C3%B6nyv_I.pdf)

Käypä hoito – suositus. Keliakia. Duodecim. 2010. Luettu 20.02.2018.

<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=hoi08001#K1>

Mäki, M., Collin, P., Kekkonen, L., Visakorpi, J. & Vuoristo, M. 2006. Keliakia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Repo, M. 10.8.2015. Tutkimussuunnitelma. Anemia ja raudanpuute keliakiassa.

Repo, M., Lindfors, K. & Kurppa, K. 2016. Anemia ja keliakia. Uudet värjäysprotokollat.

Salmi, T., Lindfors, K., Kurppa, K. & Kaukinen, K. 2017. Keliakian muuttuva diagnostiikka.

Salonen, J. 2017. Duodecim terveyskirjasto. Anemia. B12-vitamiinin tai foolihapon puutos. Luettu 19.02.2018. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00788](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00788)

The Human Protein Atlas. Luettu 30.03.2018. <https://www.proteinatlas.org/>

**LIITTEET**

Liite 1. Liuostaulukko

liuos	aineet	punnittu <i>m</i> (g)	tilavuus (ml)	liuotin
natriumsitraattipuskuri (kanta)	natriumsitraatti	29,4	1000	vesi
PBS-kantaliuos	natriumkloridi	160	2000	vesi
	kaliumkloridi	4		
	kidevedetön natriumvetyfosfaatti	28,48		
	kaliumdivetyfosfaatti	4		
BSA-PBS	BSA	0,025	25	PBS
Tris-EDTA-kantaliuos	Tris	12,1		
	EDTA	3,7	500	vesi
TBS	Trizma-base	12,1	500	vesi
	natriumkloridi	40		
BSA-maitojauhe	BSA	0,5	10	vesi
	maitojauhe	0,5		