



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# **IMMUNOHISTOKEMIAALLISET CD-VÄRJÄYK- SET**

Tukimateriaali Fimlab Laboratoriot Oy:n patologian  
laboratoriolle

Iina Puuppo

Viktoria Pälvi

Opinnäytetyö  
Marraskuu 2015  
Bioanalytiikka



# TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikkokoulutus

PUUPPO IINA & PÄLVI VIKTORIA  
Immunohistokemialliset CD-värjäykset  
Tukimateriaali Fimlab Laboratoriot Oy:n patologian laboratoriolle

Opinnäytetyö 34 sivua  
Marraskuu 2015

---

Opinnäytetyön aiheena on immunohistokemialliset CD-värjäykset. Immunohistokemiassa kudoksenäytteissä ja sytologisissa näytteissä esiintyviä antigeenejä voidaan tunnistaa spesifisen vasta-aineen avulla. Vasta-aineeseen on konjugoitu näkyvä leima, jonka avulla vasta-aineen ja antigeenin reaktio saadaan mikroskoopilla näkyväksi. CD-markkerit ovat pääasiassa valkosolujen pinnalla esiintyviä antigeenejä, joiden avulla voidaan erilaiset valkosolut ja niiden erilaistumisvaiheet erotella toisistaan.

Työn tarkoituksena oli tehdä tukimateriaali immunohistokemiallisista CD-värjäyksistä Fimlab Laboratoriot Oy:n patologian laboratorion käyttöön. Tavoitteena oli kehittää värjäysten laatua. Tukimateriaaliin tärkeimpänä sisältönä oli hyvät kuvat erilaisista CD-värjäyksistä. Näihin kuviin laboratorion työntekijät voivat verrata omia värjäyksiään. Lisäksi materiaalissa kerrotaan kudosten värjäytyvyydestä ja esitellään positiiviset kontrollikudokset.

Opinnäytetyön toteuttamistapa oli toiminnallinen, eli se sisältää raporttiosuuden ja varsinaisen tuotoksen. Tuotoksena syntyi tukimateriaali. Raporttiosuus koostettiin immunohistokemian, CD-järjestelmän ja tukimateriaalin kirjoittamisen teoriasta. Lisäksi siitä löytyy menetelmällisten lähtökohtien esittely ja opinnäytetyöprosessin kuvaus.

Varsinainen Fimlabin käyttöön tarkoitettu tukimateriaali sisältää luottamuksellista tietoa. CD-värjäyksissä käytettyjä vasta-aineklooneja ei saa julkisesti paljastaa. Tämän vuoksi yleisesti julkaistavasta versiosta nämä tiedot on poistettu.

---

Asiasanat: immunohistokemia, kudosisvärjäys, antigeenit, vasta-aineet

## **ABSTRACT**

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

PUUPPO IINA & PÄLVI VIKTORIA  
Immunohistochemical CD-Stains  
Support Material for the Laboratory of Pathology in Fimlab Laboratories PLC

Bachelor's thesis 34 pages  
November 2015

---

Immunohistochemistry is a staining process used in pathology. The antigens in cells of a tissue section can be detected by exploiting the principle of antibodies binding specifically to antigens. Antibodies contain a label in order to make the reaction between antigens and antibodies visible under the microscope. CD-markers are one of these antigens to be searched for by immunohistochemistry.

The purpose of this study was to create a support material for the Laboratory of Pathology in Fimlab Laboratories PLC. The objective is to improve the quality of the laboratory. The most important content of the material was good quality pictures of the stains so that the employees can compare their staining results to these pictures. Antibody clones used in the laboratory is confidential and this is why this information had to be removed from the public version.

The approach to this thesis was functional. This means that the thesis consists of two separate parts, the support material and the report section. The report describes the theory of immunohistochemistry but also how the material was done.

---

Key words: Immunohistochemistry, Tissue staining, Antigens, Antibodies

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	IMMUNOHISTOKEMIA .....	6
2.1	Immunohistokemian perusteet .....	6
2.2	Värjäyksien käyttö .....	7
2.3	Värjäysmenetelmät .....	7
2.3.1	Fluoresenssimenetelmät .....	8
2.3.2	Entsyymimenetelmät.....	9
2.3.3	Polymeerien käyttöön perustuvat leimausmenetelmät.....	10
2.3.4	Muut menetelmät .....	11
2.4	Immunohistokemiallisten värjäysten vaiheet.....	12
2.4.1	Fiksaatio .....	12
2.4.2	Näytemuodon valinta .....	12
2.4.3	Parafiinileikkeiden kudosprosessointi.....	13
2.4.4	Valaminen ja leikkaaminen.....	13
2.4.5	Antigeenien paljastus .....	14
2.4.6	Endogeenisen entsyymiaktiivisuuden esto.....	14
2.4.7	Värjäys .....	15
2.4.8	Värjäyksen loppukäsittelyt.....	15
2.5	Laatu immunohistokemiassa.....	15
3	CD-VÄRJÄYKSET .....	17
3.1	Yleistä CD-järjestelmästä .....	17
3.2	Opinnäytetyössä käsiteltävät CD-vasta-aineet.....	18
3.3	Värjäysmenetelmä .....	22
3.4	CD-värjäysten laatu .....	23
4	TUKIMATERIAALIN TEORIA .....	25
5	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT .....	26
6	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT .....	27
7	TUOTOS .....	28
7.1	Tukimateriaalin sisältö.....	28
7.2	Tukimateriaalin ulkoasu .....	28
8	OPINNÄYTETYÖPROSESSI.....	29
8.1	Opinnäytetyön suunnittelu .....	29
8.2	Opinnäytetyön toteutus .....	29
8.3	Opinnäytetyön käytettävyyden arviointi.....	30
9	POHDINTA.....	31
	LÄHTEET.....	33

## 1 JOHDANTO

Immunohistokemia (IHC) on patologian osa-alue, jossa kudosten värjäys tapahtuu anti-geenien ja leimattujen vasta-aineiden avulla (Renshaw 2007, 1). Vasta-aineella, joka sisältää näkyvän leiman, on kyky sitoutua tiettyyn antigeeniin, jolloin tätä antigeeniä ilmentävät kohdat kudoksissa saadaan näkyviksi ja pystytään paikantamaan (Suvana, Layton & Bancroft 2013, 382–383). Immunohistokemian tärkeä käyttöalue on kasvaindiagnoosi ja sen avulla voidaan mm. erottaa toisistaan karsinomat eli pahanlaatuiset kasvaimet, lymfoomat (imusuolmukesyöpä), sarkoomat (tuki- ja liikkokudossyöpä) ja melanoomat (ihosyöpä). Hyvänä esimerkkinä IHC:n käytöstä on erilaisten lymfoomien erottelu valkosolujen pinta-antigeenien avulla. (Joensuu, Roberts, Kellokumpu-Lehtinen, Jyrkkö, Kouri & Teppo 2013, 97–98.) CD-markkerit puolestaan ovat pääasiassa valkosolujen pinnalla esiintyviä antigeenejä. Erilaiset ja eri erilaistumisvaiheissa olevat valkosolut ilmentävät erilaisia pinta-antigeenejä ja näiden avulla valkosoluja voidaan tunnistaa. (Abbas & Lichtman 2005, 20.)

Opinnäytetyömme tarkoitus on tehdä Fimlab Laboratoriot Oy:n patologian laboratorion käyttöön materiaali immunohistokemiallisista CD-värjäyksistä mikroskoppoinnin tueksi. Tavoite on tukea värjäysten tekijöitä värjäyslaadun arvioinnin parantamisessa sekä tulokinnassa. Materiaali sisältää kuvat kyseisillä värjäyksillä värjätystä näytteistä. Lisäksi kerrotaan mm. laboratorion käytössä olevat kontrollikudokset ja esitellään mitä värjäykset värjäävät. Työmme koostuu kahdesta osasta: raporttiosuudesta ja immunohistokemian CD-värjäysten tukimateriaalista. Opinnäytetyömme on siis toiminnallinen opinnäytetyö. Opinnäytetyömme raporttiosuudessa käsitellään immunohistokemian, CD-värjäysten ja tukimateriaalin laatimisen teoriaa, sekä kerrotaan menetelmällisistä lähtökohdista ja opinnäytetyöprosessista.

Valitsimme aiheen, sillä olimme kumpikin kiinnostuneita patologiasta. Pidimme myös siitä, että opinnäytetyön toteuttamistapa oli toiminnallinen. Näin ollen teoriapohjan selvittämisen jälkeen itse opinnäytetyötuotoksen teko oli hyvin käytännönläheistä.

## 2 IMMUNOHISTOKEMIA

### 2.1 Immunohistokemian perusteet

Immunohistokemia on tietyn antigeenin tunnistamista histologisesta kudosteesta tai sytologisesta solunäytteestä spesifisen vasta-aineen avulla (Renshaw 2007, 1). Vasta-aineet ovat proteiinimolekyyliä, joita esiintyy mm. veressä ja kudoksissa. Vasta-aineet kuuluvat humoraaliseen (vasta-ainevälitteiseen) immuunivasteeseen ja niitä tuotetaan plasmassa. Antigenit puolestaan ovat molekyylejä, jotka aikaansaavat vasta-aineiden tuotannon. Ne sisältävät yhden tai useamman vasta-aineen sitoutumiskohdan, eli epitopin. Vasta-ainemolekyylin aminohappoketju on muodoltaan ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan komplementaarinen antigeenin tietylle epitopille ja nämä kohdat sitoutuvat toisiinsa erilaisilla kemiallisilla sidoksilla. (Suvana ym. 2013, 383.) Vasta-aineen kiinnittyminen kohdeantigeeniin saadaan mikroskooppilla nähtäväksi vasta-aineseen kiinnitetyn näkyvän leiman avulla. Leiman detektio perustuu entsymaattiseen kemialliseen menetelmään tai fluoresenssi-ilmiön havaitsemiseen. (Renshaw 2007, 1.)

Immunohistokemiassa antigeenien tunnistamiseen voidaan käyttää joko polyklonaalisia tai monoklonaalisia vasta-aineita. Polyklonaalinen vasta-aine on antigeenin useampaa eri epitoppia tunnistavien vasta-aineiden seos, kun taas monoklonaalinen vasta-aine sisältää vain antigeenin yhtä tiettyä epitoppia tunnistavaa vasta-ainetta. (Suvana, Layton, & Bancroft 2013, 384.) Koska monoklonaaliset vasta-aineet tunnistavat vain tiettyä epitoppia, aiheuttavat ne polyklonaalisia vasta-aineita vähemmän ristireaktioita muiden proteiinien kanssa. Näin ollen taustavärjäytyminen on vähäisempää kuin polyklonaalisilla vasta-aineilla. Toisaalta polyklonaalisilla vasta-aineilla on korkea affiniteetti ja ne voivat tunnistaa pieniäkin määriä kohdeantigeeniä. Lisäksi niiden käyttö on monoklonaalisia vasta-aineita nopeampaa. (A comparison between polyclonal and monoclonal.)

Immunohistokemiallisia preparaatteja voidaan valmistaa erilaisista kudoksista ja erilaisista näytemuodoista. Värjäyksiä voidaan tehdä parafiini- ja jääleikkeille sekä sytologille näytteille. Näytemuoto- ja materiaali vaikuttavat immunohistokemiallisen värjäys- tekniikan valintaan. (Bancroft & Gamble 2008, 438.)

## 2.2 Värjäyksien käyttö

Immunohistokemialliset värjäykset ovat paljon käytettyjä menetelmiä patologian laboratorioissa. Niiden avulla voidaan vahvistaa diagnoosi, arvioida ennuste ja todeta vaste hoi-toihin. Immunohistokemiallisten menetelmien avulla voidaan tutkia myös sairauksien pa-togeneesiä, eli miten ne syntyvät ja kehittyvät. (Bancroft & Gamble 2008, 493.)

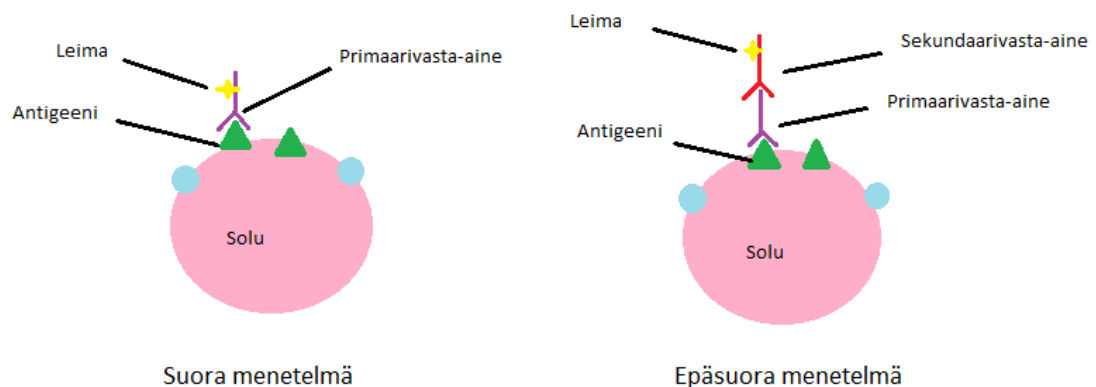
Yhtenä tärkeimmistä käyttökohteista immunohistokemiallisille värjäyksille on kasvain-diagnostiikka. Käyttämällä spesifisiä syöpämerkkiaineita, immunohistokemiaa voidaan käyttää hyvä- ja pahanlaatuisten kasvainten erottelussa, määrittämään sen vaihe ja luokka sekä identifioimaan metastaasin solun tyyppi ja siten löytämään primaarikasvaimen si-jainti. Lisäksi värjäyksiä voidaan käyttää joidenkin infektiotautien yhteydessä tunnistamaan infektion aiheuttaja kudoksesta. Menetelmän etuna on sen nopeus perinteisiin mikrobiologian viljelytekniikoihin verrattuna. Lisäksi sitä voidaan käyttää apuna joidenkin neurodegeneratiivisten sairauksien ja lihassairauksien diagnostiikassa. (Bancroft & Gamble 2008, 493–510.)

Näiden lisäksi immunohistokemiaa voidaan käyttää biologisissa tutkimuksissa sekä lääkkeiden kehityksessä. Lääkkeiden kehityksessä immunohistokemiaa voidaan hyödyntää lääkkeiden vaikutuksien testaamiseen. Menetelmän avulla pystytään esimerkiksi havaitsemaan kehossa sairaan kohdan aktiivisuuden vähentyminen tai lisääntyminen. (Overview of Immunohistochemistry.)

## 2.3 Värjäysmenetelmät

Jotta antigeenin ja sitä tunnistavan vasta-aineen välinen sitoutumisreaktio voidaan nähdä mikroskoopissa, vasta-aine täytyy ensin leimata eli siihen kiinnitetään jokin detektion mahdollistava molekyyli. Leimaavana aineena käytetään yleisesti entsyymejä tai fluoro-kromeja, mutta myös muita tekniikoita on olemassa. (Buchwalow & Böcker 2010, 9–10.) Nykyään käytetään useimmiten polymeeriteknologiaan perustuvia menetelmiä, joissa polymeerirunkoon on kiinnitetty useita vasta-aineita ja detektion mahdollistavia entsyymejä. (Kumar & Rudbeck 2009, 68.)

Immunohistokemiallinen värjäys voidaan tehdä joko suoraa tai epäsuoraa menetelmää käyttäen (Kuva 1.). Suorassa menetelmässä leimausaine on kiinnittynyt suoraan primaarivasta-aineeseen. Epäsuorassa menetelmässä puolestaan leima on sekundaarivasta-aineessa, joka on kiinnittynyt primaarivasta-aineeseen. (Bancroft & Gamble 2008, 438.) Suora menetelmä on nopeampi ja yksinkertaisempi tehdä, mutta epäsuoran menetelmän etuna on sen herkkyys. Epäsuoran menetelmän avulla on mahdollista saada näkyville heikkojakin vasta-ainepitoisuuksia. (Smith 2015.) Perinteisen suoran tai epäsuoran menetelmän lisäksi nykyään on käytössä erilaisia variaatioita. Esimerkiksi (strept)avidibiini-biotiini-tekniikka on hyvin käytetty menetelmä. (Bancroft & Gamble 2008, 440.)



KUVA 1. Suora ja epäsuora menetelmä (KUVA: Iina Puuppo ja Viktoria Pälvi 2015)

### 2.3.1 Fluoresenssimenetelmät

Fluoresenssitekniikoiden avulla antigeeneihin sitoutuneet vasta-aineet saadaan näkyviksi fluoresoivien leimojen avulla. Vasta-aineeseen konjugoitu fluorokromi absorboi tietyn aallonpituuden omaavaa valoa, jolloin sen elektronit virittyvät korkeaan energiasolun tilaan. Tämän viritystilän jälkeen fluorokromi emittoi valoa, jonka aallonpituus on yleensä pidempi kuin ennen viritystilaa. Fluoresenssitekniikalla voidaan saada hyvin pienellä tasolla toimivia antigeenin ja vasta-aineen reaktioita havaittua. Esimerkiksi pieniä solun



pintarakenteita, soluelimiä, bakteereita ja viruksia voidaan tunnistaa immunofluoresenssivärjäyksellä. Immunofluoresenssivärjäyksen etuna muihin immunovärjäyksiin on, että sen avulla voidaan kudoksesta tunnistaa tarkka reaktiokohta. (Bancroft & Gamble 2008, 517.)

Fluoresenssimenetelmällä värjättyjen näytteiden tulkinta vaatii fluoresenssimikroskoopin. Mikroskoopin tulee luovuttaa mahdollisimman paljon eksitaatioenergiaa fluorokromille, jotta värjäytymiskohta olisi mahdollisimman näkyvä. Oikeanlaisen valonlähteen ja filterin valinta on erittäin tärkeää onnistuneen näytteen saavuttamiseksi. (Bancroft & Gamble 2008, 522.)

Fluoresoivina väriaineina eli fluorokromeina käytetään esimerkiksi fluoreskeiini-isotiosyanaattia (FITC) tai tetrametyylirodamiini-isotiosyanaattia (TRITC). FITC emittoi vihreää väriä aallonpituusalueella 518 nm. TRITC:n fluoresenssi on puolestaan puna-oranssi aallonpituusalueella 580 nm. (Suvarna ym. 2013, 427.) Happamissa olosuhteissa nämä fluorokromit muodostavat kovalenttisia sidoksia proteiinien kanssa (Bancroft & Gamble 2008, 529–520). Muita käytettyjä värejä ovat mm. Alexa Fluor -fluorokromit, joiden etuina esim. FITC:n verrattuna on, että ne ovat väriltään kirkkaampia eivätkä haa-listu yhtä nopeasti (Renshaw 2007, 40).

### 2.3.2 Entsyymimenetelmät

Entsyymileimausmenetelmissä vasta-aineet leimataan entsyymien avulla, jolloin pystytään osoittamaan vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiskohdat kudosteissa. Käyttämällä väriainetta eli kromogeenia, reaktiopaikalle saadaan aikaan värillinen sakka. Täten tutkittavan antigeenin sijainti pystytään paikantamaan valomikroskoopilla käyttämällä kirkaskenttäasetusta. (Neukkarinen 2002, 18.) Tällä hetkellä käytetyin entsyymi on pi-parjuuren peroksidaasi (HRP eli horseradish peroxidase) (Suvarna ym. 2013, 385). Käytettävissä on luotettavia menetelmiä peroksidaasien paikantamiseen, joissa näillä leimat-tuja vasta-aineita voidaan käyttää hyväksi (Kiernan 1999, 400).

Muita entsyymejä, joita voidaan käyttää, ovat esimerkiksi alkalinen fosfataasi,  $\beta$ -galaktosidaasi ja glukoosioksidaasi, joita voidaan käyttää leimaamattomissa vasta-aine- ja

entsyymimenetelmissä sekä avidiini-biotiini menetelmissä. Hyöty, joka saadaan käyttämällä useita eri entsyymejä immunohistokemiallisina leimoina, on havainnollistaa useampaa kuin yhtä antigeenia samasta kohdasta eri väreillä. (Kiernan 1999, 402.)

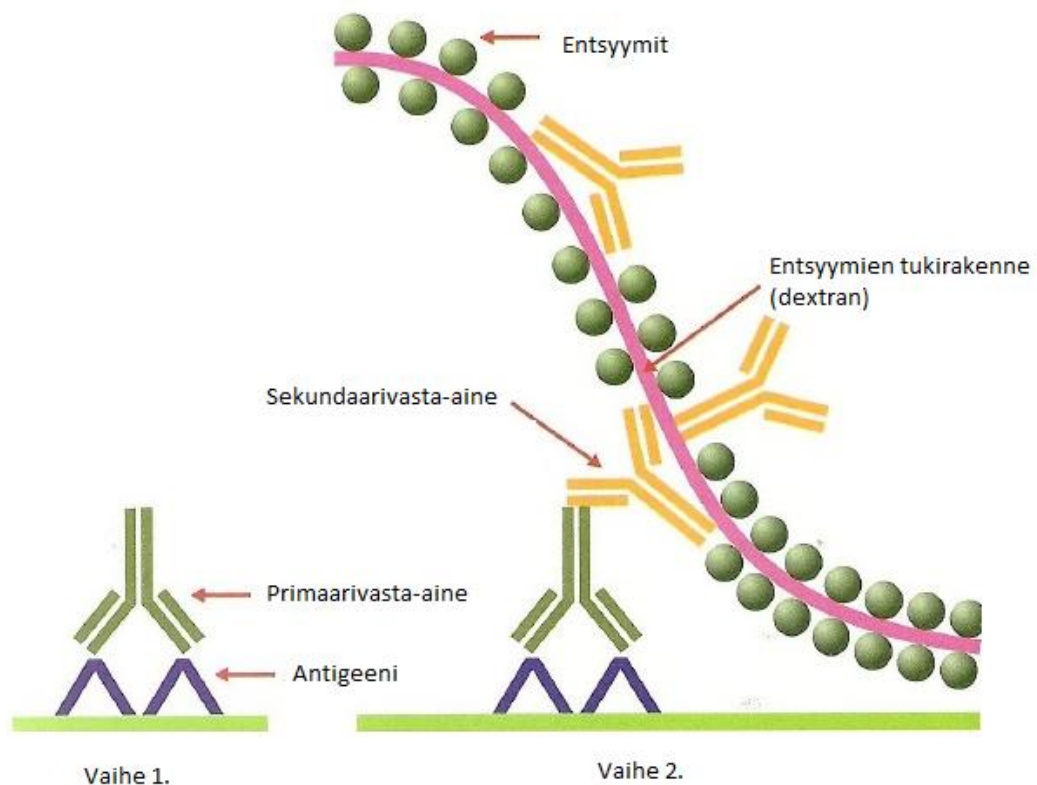
Immunoentsyymimenetelmissä voidaan käyttää avidiinin ja biotiinin välistä voimakasta sitoutumista. Lisäksi entsyyminä on käytössä joko peroksidaasi tai alkalinen fosfataasi. (Neukkarinen 2002, 20.) Biotiini on monenlaisten mikro-organismien aineenvaihdunnan tuotteena syntynyt vitamiini, joka muodostaa koentsyymin tai useista entsyymeistä koostuvan ryhmän, joka siirtää karboksyyli ryhmiä. Avidiini on kananmunan valkuaisen glykoproteiini, joka koostuu neljästä identtisestä aliyksiköstä, joista jokainen on kykenevä kiinnittymään biotiinimolekyyliin. (Kiernan 1999, 405.)

Yleisimmin käytössä on kaksi menetelmää, joissa kummassakin käytetään biotiinilla leimattua sekundaarivasta-ainetta. Tätä tapahtumaa kutsutaan biotinyloimiseksi. Avidiini-biotiininimenetelmässä (LAB) entsyymi on konjugoitu avidiiniin. Avidiini-biotiini-kompleksimenetelmässä (ABC) avidiini, biotiini ja entsyymi muodostavat kompleksin, jossa entsyymi on kiinnittyneenä biotiiniin ja biotiini avidiiniin. Tällöin avidiiniin jää vapaita biotiinia sitovia kohtia, joilla kompleksi kiinnittyy sekundaarivasta-aineeseen, joka on biotinyloitu. Mikäli menetelmää on käytetty oikein, se antaa vähän taustaa ja herkkyys on hyvä. (Neukkarinen 2002, 20.) Avidiinin sijaan voidaan käyttää strepavidiniä, jolla on samat ominaisuudet kuin avidiinilla, joka on kuitenkin viisi kertaa kalliimpaa kuin avidiini. (Kiernan 1999, 405.)

Avidiini-biotiininimenetelmillä on muutamia rajoituksia, jotka saattavat heikentää leimauksen onnistumista. Näitä ovat esimerkiksi kudosten endogeenisen biotiinin esiintyminen, joka saattaa aiheuttaa taustavärjäytymistä. Formaliinifiksaatio ja parafiiniin valettujen kudosten leikkien käyttö vähentää em. Taustavärjäytymistä, mutta sitä voidaan kuitenkin havaita esim. maksasta ja munuaisesta peräisin olevissa leikkeissä sekä antigeenien palauttamisen yhteydessä endogeeninen biotiini esiintyy epätoivottavana sivuvaikutuksena. Erityisesti käytettäessä jääleikettä leikemateriaalina kudospärisen biotiinin määrä on korkeampi ja siten häiritsee tulkintaa. (Kumar & Rudbeck 2009, 68.)

### **2.3.3 Polymeerien käyttöön perustuvat leimausmenetelmät**

Biotiinin käyttöön liittyvien rajoitusten takia polymeerien käyttöön perustuvat immunohistokemialliset menetelmät, jotka eivät liity biotiiniin, ovat nousussa. Nämä menetelmät käyttävät hyväkseen teknologiaa, joka perustuu polymeereihin, joihin on konjugoitu useita vasta-aineita ja entsyymimolekyyliä. Esimerkiksi yksivaiheisessa polymeerimenetelmässä dextraaniin (dextran) on konjugoitu jopa 70 eri entsyymimolekyyliä ja 10 primaarivasta-ainetta. Tällä menetelmällä pystytään suorittamaan koko immunohistokemiallinen leimaustoimenpide onnistuneesti yhdellä vaiheella. Myös kaksivaiheista menetelmää voidaan käyttää (kuva 2.). Polymeerikompleksien suuresta koosta johtuen sekä siitä, miten molekyylit kompleksissa ovat asettuneet, tiettyihin epitoppeihin pääsy on rajoitettu osassa tapauksista. Polymeereihin perustuvien menetelmien sensitiivisyys verrattuna LSAB- (Labeled Streptavidin Biotin) ja ABC-menetelmiin (Avidin-Biotin Complex) on vähintään yhtä hyvä tai jopa hieman parempi. Polymeerien käyttöön perustuvat menetelmät ovat erittäin herkkiä, jolloin niillä saadaan pienetkin antigeenimäärät esille. (Kumar & Rudbeck 2009, 58–59).



KUVA 2. Kaksivaiheinen polymeerimenetelmä (Kumar & Rudbeck 2009, 59, muokattu)

#### 2.3.4 Muut menetelmät

Muissa harvemmin käytettyissä värjäysmenetelmissä käytetään merkkiaineina kolloidisia metalleja tai radioisotooppeja. Kolloidisista metalleista kulta aiheuttaa valomikroskooppilla nähtävän vaaleanpunaisen detektion, mutta yleisemmin sitä käytetään elektronimikroskopiassa. Radioisotooppien käyttö leimausaineena on erittäin harvinaista ja rajoittuu lähinnä kvantitatiivisiin immunohistokemiallisiin tutkimuksiin. (Bancroft & Gamble 2008, 437-438.)

## **2.4 Immunohistokemiallisten värjäysten vaiheet**

### **2.4.1 Fiksaatio**

Ennen värjäyksen suorittamista kudoksesta on valmistettava värjäykseen sopivaksi. Ensimmäinen vaihe on näytteenottotilanne, jossa kudospala ensin erotetaan sen normaalista ympäristöstä (elimistöstä ruumiinavauksen yhteydessä tms.), paloitellaan sopivan kokoiseksi ja sen jälkeen on välttämätöntä, että näytteet fiksoidaan formaliinissa tai muussa fiksativissa mahdollisimman nopeasti. (Laasonen ym. 2002, 12.) Heti, kun kudospala on poistettu elävästä elimistöstä, se altistuu antigeeneja vahingoittaville vaikutuksille. Näitä ovat esimerkiksi hypoksia (vähentynyt hapensaanti), lysosomaaliset entsyymit (hajottavat rakenteita) sekä bakteerien ja homeiden aiheuttama hajoaminen. (Renshaw 2007, 47–48.)

Käytetyimmät fiksatiiivit ovat proteiineja denaturoivat formaliini ja asetoni. (Renshaw 2007, 47–48.) Formaliinin etuina on, että se säilyttää antigeenisyyden ja primaari- sekä sekundaarirakenteet yleensä hyvin. Toisaalta se voi muuttaa antigeenirakenteiden varauksia sekä aiheuttaa ristsidoksia näytteen antigeenien päälle, mikä edellyttää esikäsitteilyä antigeenien uudelleen paljastamiseksi lämmön tai entsyymien avulla. (Neukkarinen 2002, 12.)

### **2.4.2 Näytemuodon valinta**

Värjäyksiä varten näytemateriaalina käytetään yleisimmin viittä erilaista näytemuotoa: parafiiniin valettuja kudokskappaleita, jääleikkeitä, tuorenäytettä (free-floating section), sytologisia näytteitä (esim. irtosolu- eli PAPA-koe) sekä yksisolukerroksisia sytologisia

näytevalmisteita (esim. sytosentrifugivalmiste). Näistä eniten käytettyjä rutiinidiagnostiikassa ovat kuitenkin parafiini- ja jääleikkeet (Renshaw 2007, 45.)

Parafiinileike on yleisimmin käytetty näytemuoto. Parafiiniin valettujen kudokset leikkaamisen yhteydessä kudokselle tukea, jolloin se säilyttää muotonsa. Toiseksi tärkeimpänä ja yleisimpänä näytemuotona käytetään jääleikkeitä. Jääleikettä käytetään materiaalina, jos halutaan vastaus nopeasti ja sillä odotetaan olevan vaikutusta esimerkiksi käynnissä olevan leikkauksen kulkuun tai halutaan visualisoida tiettyjä antigeenejä, jotka tuhoutuvat helposti fiksaation ja normaalin kudosprosessin seurauksena. Jääleikkeiden valmistamiseen ei tarvita suuremmin fiksointia, koska leikkeet tehdään heti. Näinollen jäädytetyt leikkeet säilyttävät kudoksessa olevat antigeenit paremmin ja jättävät ne enemmän alkuperäiseen muotoon. (Renshaw 2007, 46.)

#### **2.4.3 Parafiinileikkeiden kudosprosessointi**

Ennen parafiiniin valamista parafiinileikkeille tulee tehdä kudosprosessointi, jossa näytteistä poistetaan vesi ja fiksatiivi ja näytteet kirkastetaan. Veden ja fiksatiivin poisto tapahtuu nousevan alkoholisarjan avulla. Tämän jälkeen näyte kirkastetaan ja alkoholi korvataan esimerkiksi ksyleenillä. Vesi tulee poistaa, sillä se ei sekoitu parafiinin kanssa. Ksyleeni puolestaan sopii kirkastukseen hyvin, sillä se sekoittuu sekä alkoholin että parafiinin kanssa. (Renshaw 2007, 56.)

#### **2.4.4 Valaminen ja leikkaaminen**

Kudosprosessin jälkeen parafiinileike voidaan valaa tukimateriaalina käytettävään netemäiseen parafiiniin. Jotta parafiini pysyy nestemäisenä valamisen ajan, tulee se pitää kuumana. Apuna valamisessa käytetään sopivan kokoista muottia ja kasettia. Kun parafiinivaha on jähmettynyt, voidaan näyte leikata. (Orchard & Nation 2012, 110–112.) 4µm:n paksuiset leikkeet saadaan aikaiseksi mikrotomilla (mekaaninen kudosten leikkauslaite). Ennen leikkeiden värjäämistä immunohistokemiallisesti, parafiini täytyy poistaa lasilta alkoholi- ja ksyleenikäsittelyillä. (Renshaw 2007, 45–46.)

Jääleike puolestaan valmistetaan siten, että tuore kuduskappale jäädytetään aluksi esimerkiksi nestemäisellä tyypellä. Tämän jälkeen se asetetaan jääleikemikrotomiin ja siitä leikataan 4µm:n paksuisia leikkeitä, jotka sijoitetaan näytelasille. Jääleikkeiden valmistaminen on teknisesti haastavampaa kuin parafiinista valettujen. (Renshaw 2007, 46.)

#### **2.4.5 Antigeenien paljastus**

Formaliinin käyttö fiksatiivina voi aiheuttaa antigeenien peittymisen muodostamalla ristidoksia niiden päälle, joilloin vasta-aineet eivät kykene tarttumaan niihin. Antigeenit voidaan saada taas näkyviksi altistamalla kudisleikkeet lämmölle tai valkuaisaineita pilkkovalle entsyymille ennen immunohistokemiallisen värjäyksen suorittamista. Näiden palauttamisen teho riippuu fiksoinnin kestosta, ilmennettävästä antigeenistä itsestään sekä palauttamisprosessin tyypistä ja olosuhteista. Kudisleikkeiden tulisi olla kiinnitetty niille soveltuville lasille, sillä lämpökäsittelyn ankarat olosuhteet aiheuttavat usein esimerkiksi sen, että leikkeet liukuvat lasilta pois. (Renshaw 2007, 59.)

#### **2.4.6 Endogeenisen entsyymiaktiivisuuden esto**

Kun värjäyksessä käytetään entsyymaattista menetelmää, on mahdollista, että kudoksissa esiintyvä entsyymiaktiivisuus aiheuttaa taustavärjäytymistä. Näin tapahtuu, jos substraatti reagoi endogeenisten (kudoksen itse tuottamien) entsyymien kanssa, jotka ovat samankaltaisia kuin vasta-aineen leimausaineena käytetty entsyymi. Tällöin tuloksen tulkinta vaikeutuu. Ennen värjäystä näytteen endogeeninen entsyymiaktiivisuus ja siten taustavärjäytymistä voidaan estää esimerkiksi lisäämällä näytteisiin vetyperoksidia (immunoperoksidaasimenetelmä) tai etikkahappoa (alkaalinen fosfataasi menetelmä) ja inkuboimalla. Tällä keinolla on siis mahdollista poistaa väärän positiivisen tuloksen mahdollisuutta. (Bancroft & Gamble 2008, 452.)

### **2.4.7 Värjäys**

Immunovärjäyksissä eri vasta-aineliuokset lisätään leikkeiden päälle, jonka jälkeen niitä inkuboidaan tietyn aikaa ja huuhdellaan puskurissa. Huuhtelun avulla saadaan sitoutumaton vasta-aine näytteestä pois, jolloin vältetään tulkintaa häiritsevää taustavärjäytymistä. Detektio suoritetaan valitun leiman mukaisesti. Viimeisenä vaiheena vasta-aineen sitoutumiskohta osoitetaan värireaktiolla, joka saadaan aikaan valitulla merkkiaineella. (Neukkarinen. 2002, 19.)

### **2.4.8 Värjäyksen loppukäsittelyt**

Kun näyte on käsitelty sopivin menetelmin, suoritetaan sille oikeanlainen värjäys kudospateriaalin, näytemuodon ja vaaditun herkkyyden perusteella (Bancroft & Gamble 2008, 438). Varsinaisen immunohistokemiallisen värjäyksen jälkeen suoritetaan tarvittaessa vielä vastavärjäys, jolla saadaan tumat näkyviksi. Tähän tarkoituksen voidaan käyttää useampia erilaisia värejä, mutta käytetyimpiä on hematoksyliini. Hematoksyliini värjää tumat sinisiksi. (Renshaw 2007, 61–64.) Tämän jälkeen tehdään dehydraatio (veden poisto) nousevassa alkoholisarjassa ja näytteen kirkastus ksyleenissä. Lopuksi voidaan näyte peittää ohuella lasilla ja sopivalla peittäusaineella. (Bancroft & Gamble 2008, 462–468.)

## **2.5 Laatu immunohistokemiassa**

Koska immunohistokemia on oleellinen osa monien tautien diagnostiikkaa ja ennusteen tekemistä, on näiden värjäysten luotettavuus ensiarvoisen tärkeää. Värjäysten laatua tarkkaillaan niin ihmisten kuin koneiden suorittamien prosessien kohdalla. Laboratorioiden välillä voi olla värjäysprosesseissa eroja, mutta jokaisen laboratorion tulee noudattaa omia toimintatapojaan täsmällisesti. Näin eri värjäyskertojen tulokset ovat vertailukelpoisia. (Bancroft & Gamble 2008, 473.)

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä on monia kriittisiä kohtia, joiden epäonnistuminen vaikuttaa värjäysten laatuun ja sitä kautta tulkintaan. Näitä ovat mm. näytteiden fiksaatio, prosessointi ja antigeenin paljastus. Näissä vaiheissa tulee ottaa huomioon oikea aika,

lämpötila ja oikeat tarvittavat aineet. Kaikki käytettävät reagenssit on säilytettävä valmistajien ohjeiden mukaan ja viimeinen käyttöpäivä on huomioitava. Erityisesti vasta-aineiden säilyvyyden kannalta oikea säilytyslämpötila on kriittinen. Myös esimerkiksi pusku-  
reiden pH:n on oltava oikea värjäyksen onnistumiseksi. Laadun kannalta on tärkeää, että värjäyksen eri vaiheet on dokumentoitu, jotta jäljittäminen onnistuu. (Bancroft & Gamble 2008, 473–476.)

Näytteiden ohessa värjätyt kontrollit ovat tärkeä osa laaduntarkkailua. Jotta kontrollit ja näytteet olisivat vertailukelpoisia, tulee kontrollit käsitellä ja värjätä täsmälleen samalla tavalla kuin näytteet. Erityisesti positiivinen kontrolli on tärkeä. Kun varsinaisten näytteiden kanssa värjätään tunnettu positiivinen kudus, joka sisältää näytteestä etsittyä anti-  
geeniä, voidaan varmistua värjäysprosessin toimivuudesta. Positiivinen kontrolli tulisi olla mukana joka värjäyskerralla ja jokaiselle vasta-aineelle tulisi olla huolellisesti valittu sopiva positiivinen kontrollikudos. (Suvarna & Bancroft 2013, 440–442.) Negatiivinen kontrolli puolestaan ei saa sisältää kyseistä etsittyä antigeeniä ja tämän kontrollin värjäytyminen voi johtua esimerkiksi epäspesifeistä reaktioista kudoksissa tai väärän vasta-  
ai-  
neen käytöstä (Renshaw 2007, 219).



### 3 CD-VÄRJÄYKSET

#### 3.1 Yleistä CD-järjestelmästä

Kun aikanaan havaittiin toiminnoiltaan erilaisia leukosyyttejä, yrittivät tutkijat kehittää menetelmää, joilla ne saadaan erotettua toisistaan. Tätä tarkoitusta varten kehitettiin vasta-aineita, jotka tunnistaisivat erilaiset leukosyytit. CD-järjestelmä (Cluster of differentiation) perustuu solujen pinta-antigeeneihin eli CD-markkereihin, joita on enimmäkseen leukosyyteissä. Eri solulinjojen ja erilaistumisvaiheiden pinta-antigeeneillä on erilainen rakenne ja nämä on mahdollista tunnistaa joukolla monoklonaalisia vasta-aineita. (Abbas & Lichtman 2005, 20.). Ihmisillä CD-proteiineja on laskettu olevan yli 350 kappaletta. Pieniä määriä CD-proteiineja ilmentyy myös endoteelisoluissa, erytrosyyteissä sekä kantasoluissa. Ne eivät ole kuitenkaan pelkästään markkereita solun pinnalla. Ne toimivat esim. reseptoreina, muuttavat solun käyttäytymistä ja niillä on myös muita toimintoja, kuten soluadheesio. (Cluster of Differentiation (CD).)

Pintamolekyyli eli antigeeni voidaan nimetä CD-numerolla, kun kahden spesifisen monoklonaalisen vasta-aineen on osoitettu sitoutuvan tähän molekyyliin. (Cluster of Differentiation (CD).) Esimerkiksi suurin osa T-lymfosyyteistä ovat antigeenien ilmentymiseltään CD3+CD4+CD8- ja sytotoksiset lymfosyytit (CTLs) ovat CD3+CD4-CD8+, jolloin kyseiset solut voidaan erotella toisistaan ja tarkastella tästä saatuja tuloksia potilaan kliiniseen kuvaan ja mahdollisesti saada vahvistus diagnosoille (Abbas & Lichtman 2005, 20.) Nämä antigeenit voidaan jakaa useisiin kategorioihin: jotkut niistä ovat spesifisiä tietyn solulinjan soluille ja joidenkin ilmentyminen riippuu aktivoitumisen tasosta tai samojen solujen erilaistumisesta. (Cluster of Differentiation (CD).)

Leukosyyttien luokittelua CD-antigeenien ilmentämisen avulla käytetään nykyään hyvin laajasti kliinisessä lääketieteessä esimerkiksi immunohistokemiassa ja immunologiassa. (Abbas & Lichtman 2005, 20.) Koska CD-antigeeneja käytetään esimerkiksi solumarkkereina tunnistamaan soluja mikropartikkeleihin perustuen, voidaan niitä käyttää hyväksi syöpien tai muiden sairauksien diagnosoinnin varmentamisessa (Cluster of Differentiation (CD)). Vertailevassa kokeilututkimuksessa käytettiin koehenkilöinä terveitä ja akuuttia sepelvaltimotautia sairastavia, joilta tutkittiin CD-antigeenien ilmentymistä fluo-

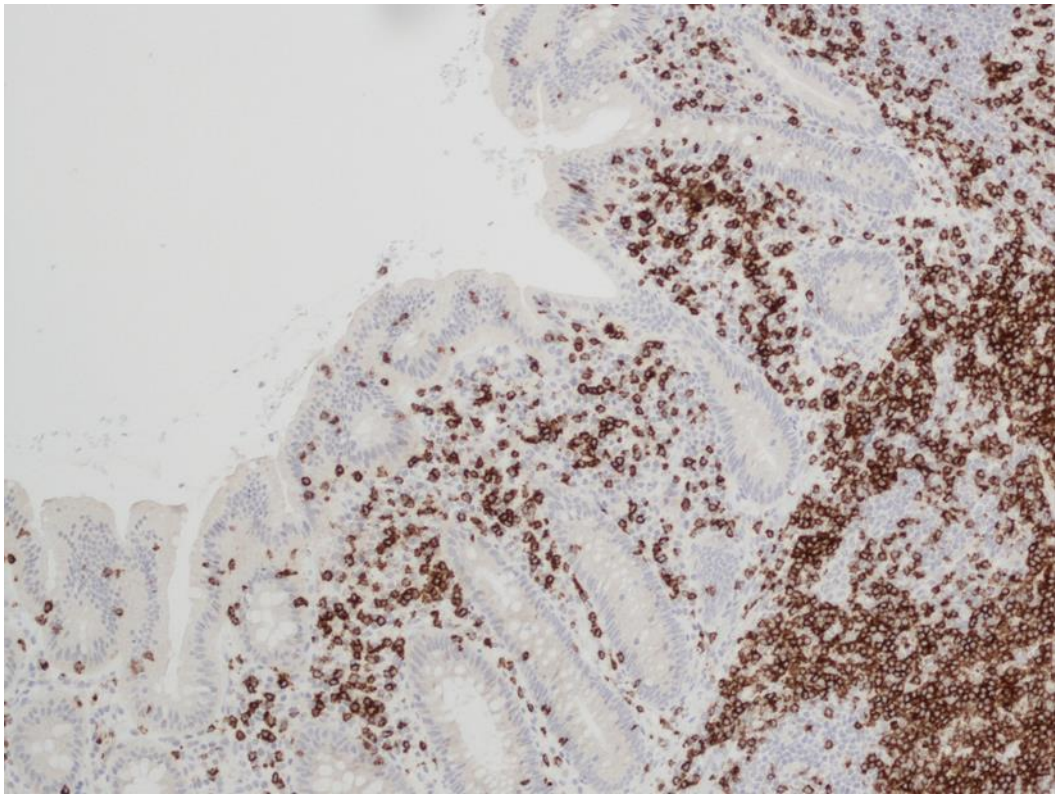
resenssilla leimatuilla vasta-aineilla. Mikropartikkelien, jotka kiersivät akuuttia sepelvaltimotautia sairastavien henkilöiden plasmassa, määrät olivat kohonneet ja ne ilmensivät tutkittuja CD-antigeenejä. Tuloksia tulkittaessa voitiin todeta, että seuraavat kymmenen eri leimattua antigeenia ilmensivät merkittävästi enemmän valoa akuuttia sepelvaltimotautia sairastavalla koeryhmällä verrattuna terveisiin: 44, 45, 54, 62E, 79, 102, 117, 130, 138 sekä 154. CD-antigeenien ilmentämisen havaitsemista on tarkoitus kehittää muidenkin tautitilojen kohdalla, jotta pystytään saamaan uusia ja entistä tarkempia menetelmiä sairauksien diagnosoimiseksi. (Lal, Brown, Nguyen, Braet, Dyer & dos Remedios 2009.)

### 3.2 Opinnäytetyössä käsiteltävät CD-vasta-aineet

Opinnäytteeksi tehdyssä tukimateriaalissa käsitellään 17:a Fimlabin patologian laboratoriossa immunohistokemiallisissa värjäyksissä yleisesti käytettyä CD-vasta-ainetta, joiden avulla tunnistetaan CD-markkereita. Nämä kyseiset vasta-aineet valikoituivat sen mukaan, mitkä ovat pääsääntöisesti käytetyimpiä Fimlabin patologian laboratorioissa.

**CD1a**-antigeenia on seuraavien solujen ulkokalvoilla: dendriittisolujen (iholla sekä tonsillassa), thymosyyttien (kateenkorvassa olevia hematopoeettisia kantasoluja) sekä Langerhansin soluissa. CD1a vasta-ainetta suositellaan käytettäväksi havaitsemaan CD1a-proteiinin ilmentymistä useissa normaaleissa ja kasvainkudoksissa kuten Langerhansin soluissa histiosyyttien (makrofagien) yleinen lisääntyminen sekä thymoomissa (kateenkorvan kasvain). (Abbas & Lichtman 2005, 506.)

**CD2**-antigeenia (kuva 3.) esiintyy suurimmassa osassa perifeerisen veren T-solujen ulkopinnoista, useimmissa NK-soluissa sekä thymosyyteissä. CD2 vasta-ainetta käytetään osana vasta-ainepaneelia T-solujen aiheuttamien sairauksien luokittelussa. (Abbas & Lichtman 2005, 506.)



KUVA 3. CD2-värjäys (Iina Puuppo & Viktoria Pälvi 2015).

**CD3**-antigeenia esiintyy T-solujen ulkopinnalla. Antigeenia on myös kateenkorvassa esiintyvissä T-lymfosyyttien esiasteissa. CD3 vasta-ainetta käytetään osana vasta-ainepaneelia osoittamaan T-solujen fenotyypit lymfoproliferatiivisissa sairauksissa. (Abbas & Lichtman 2005, 506.)

**CD4**-antigeenia tavataan normaalien auttaja-T-solujen pinnalla. Sitä esiintyy myös mm. thymosyyteissä, monosyyteissä ja makrofageissa. Vasta-ainetta käytetään T-solujen aiheuttamien tautitilojen luokitteluun. (Abbas & Lichtman 2005, 506.)

**CD7**-antigeeniä esiintyy T-solujen solukalvoilla. Tutkimuksissa on todistettu, että tällä antigeenillä ei ole reaktiivisuutta muissa kuin tämän solulinjan soluissa. Hiiren CD7 vasta-ainetta käytetään osana vasta-ainepaneelia, jolla pystytään luokittelemaan T-soluista peräisin olevat kasvaimet. (Abbas & Lichtman 2005, 507.)

**CD10**-antigeenia tavataan normaalien varhaisten kantasolujen, epäkypsien luuytimen B-solujen ja lymfoidisen kudoksen germinaalisen keskuksen B-solujen pinnoilta. Antigeen-

niä voi ilmentyä myös esimerkiksi fibroblasteista ja suoliston epiteelikudoksesta. Immu-nohistokemiassa CD10-antigeeniä hyödynnetään pienien B-solulymfoomien ja lymfo-blastisten leukomioiden luokittelun erotusdiagnostiikassa. (Abbas & Lichtman 2005, 507.)

**CD15**-antigeenia todetaan 95 %:ssa perifeerisen veren kypsistä eosinofiileistä ja neutro-fiileistä, kudosten makrofageista sekä sitä ilmentyy myös monosyyteissä alhaisemmalla voimakkuudella. Lymfoidisessa kudoksessa vasta-aineena toimiva CD15 reagoi granulo-syyteissä ja Reed-Sternbergin solujen kanssa, jotka ovat välttämättömiä löytää, jotta voi-daan antaa Hodgkinin lymfooman diagnoosi. (Abbas & Lichtman 2005, 507.)

**CD19**-antigeenia on havaittu ilmentyvän B-solulinjan solujen ulkokalvolla. Värjäyty-mistä todetaan myös manttelialueella ja tonsillin reaktiokeskuksissa sekä kudoksiin läpi-tunkevilla B-lymfosyyteissa. CD19 vasta-ainetta käytetään osana vasta-ainepaneelia luo-kittlemaan B-solujen pahanlaatuiset tautitilat. (Abbas & Lichtman 2005, 508.)

**CD20cy**-antigeenia esiintyy B-solujen, dendriittisolujen, lymfosyyttien ja syöpien kanta-solujen sytoplasmassa (cytoplasmic). Sitä käytetään B-solu lymfoomien, karvasoluleuke-mioiden, B-solujen kroonisen lymfosyyttisen leukemian sekä melanoomien diagnostiik-kassa. (Abbas & Lichtman 2005, 508.)

**CD21**-antigeeni on proteiini kypsien B-solujen sekä lymfoidisen kudoksen follikulaaris-ten dendriittisolujen (FDC) solukalvolla. Käytetään CD21-antigeenien normaalien ja epä-normaalien reaktioiden ilmentämisen tulkintaan suhteessa vasta-aineisiin, joita löytyy follikulaarisista dendriittisoluista. (Abbas & Lichtman 2005, 508.)

**CD23**-antigeeni on solukalvolla oleva glykoproteiini, jota löytyy perifeerisen veren solu-jen alaryhmistä, B-lymfosyyteistä sekä B-lymfoblastisen solulinjan soluista, jotka ovat EBV:n muuntamia. Käytetään normaalien B-solujen sekä pahanlaatuisten lymfoomien tunnistamiseen kuten krooniseen B-soluleukemiaan. Manttelisolulymfooma on yleensä negatiivinen CD23: lle. (Abbas & Lichtman 2005, 508.)

**CD25**-antigeeni on yksiketjuinen glykoproteiini. IL-2 reseptoria ei löydy tavallisista T-soluista vaan sitä ilmentyy HTLV-I:n (Human T-lymphotropic virus) muuntamissa T- ja

B-soluissa, Epstein–Barrin viruksen muuntamissa B-soluissa (voi aiheuttaa tällöin lymfooman), myeloisissa prekursoreissa ja oligodendrosyyteissä. Sitä käytetään myös karvasoluleukemian diagnostiikassa. (Abbas & Lichtman 2005, 508.)

**CD30** on transmembraani sytokiinireseptori, joka kuuluu tuumori nekroosi faktori (TNF) sukuun. CD30-antigeenia ilmentymistä on havaittu Hodgkinin ja Reed-Stenberg (H-RS) soluissa, ALCL:n (large-cell lymphoma) syöpäsoluissa ja aktiivisissa B- ja T-lymfosyyteissä. Ei-lymfoidisissa kudoksissa ja kasvaimissa CD30:a on vahvistettu olevan esim. sikiöaikaisissa karsinoomissa, seminoomissa (kiveksien irtosolukasvain) sekä mesoteliomissa (keuhkopussista tai vatsakalvosta oleva kasvain). CD30 vasta-aine leimaa syöpäsoluja ALCL:ssa ja Reed-Stenberg soluja ja on hyödyllinen ALCL:n identifioimisessa sekä toissijaisena merkkiaineena Hodgkinin taudissa. Osana vasta-ainepaneelia. (Abbas & Lichtman 2005, 508.)

**CD33**-antigeeni havaitaan myelomonosyyttisten solujen solukalvoilla ja sytoplasmassa. Punasolu- sekä trombosyyttipuolen soluilla ei todettu värjäytymistä. CD33 vasta-ainetta käytetään osana vasta-ainepaneelia myeloisen- sekä monosyyttilinjan solujen identifioimiseen ja näihin solulinjoihin liittyvien leukemioiden sekä myeloproliferatiivisten sairauksien tunnistamiseen. (Abbas & Lichtman 2005, 508.)

Rotasta saatu vasta-aine **CD52** reagoi ihmisen CD52-antigeenin kanssa, joka on huomattavan pieni peptidi, jota ilmentyy voimakkaasti seuraavien solujen pinnalta: lymfosyytit, monosyytit, eosinofiilit, thymosyytit ja makrofagit. Käytetään imukudoksissa olevien pahanlaatuisten kasvainten diagnostiikassa sekä myös joissain tapauksissa myeloisten solujen löytämisessä, vaikka niissä CD52-antigeenin ilmentyminen vaihtelee huomattavasti. (Abbas & Lichtman 2005, 510.)

**CD56** on membraanin proteiini, jota ilmenee mm. NK-soluissa, osassa T-lymfosyyteistä ja neuroektodermaalisissa soluissa. Käytetään CD56-positiivisten tuumoreiden diagnostiikassa. Näitä ovat mm. neuroblastoomat ja erilaiset lymfoomat. (Abbas & Lichtman 2005, 510.)

**CD99**-antigeenia esiintyy joissakin lymfosyyteissä, T-solujen esiasteissa, joissakin munasarjojen ja keskushermoston soluissa, haimasaarekkeissa, kiveksien Sertolin soluissa ja joskus verisuonten endoteelisoluissa. Antigeeni ilmenee erityisesti Ewingin sarkoomassa

esiintyvissä tuumorisoluisissa ja primitiivisissä perifeeraalisissa neuroektodermaalisissa tuumoreissa. Käytetään myös apuna keuhkojen ja kilpirauhasen tuumoreiden luokitte-  
luun. (Abbas & Lichtman 2005, 513.)

### 3.3 Värjäysmenetelmä

Fimlabin patologian laboratoriossa immunohistokemiallisissa CD-värjäyksissä näytet-  
teriaalina käytetään ainoastaan parafiiniin valettuja kudospäytteitä. Positiivisina kontroil-  
leina käytetään erilaisia kullekin värjäykselle soveltuvia kudoksia ja negatiivisena kont-  
rollina toimii sisäinen kontrolli (näytteessä olevat kohdat, jotka eivät sisällä antigeenia).  
Kyseisten värjäysten tekemiseen käytetään tiettyä valmista pakkausta, joka sisältää tar-  
vittavat reagenssit ja immunohistokemiallista värjäysautomaattia. Käytössä oleva auto-  
maatti on Leica Biosystems sin Bond III (kuva 4.), joka on täysautomaattinen laite (BOND-  
III Fully Automated IHC and ISH). Värjäyskittinä puolestaan käytetään Leica Biosys-  
tems sin Polymer Refine Detection -kittiä (Bond™ Polymer Refine Detection).



KUVA 4. Leica Biosystems Bond III (KUVA: Iina Puuppo ja Viktoria Pälvi)

Polymer Refine Detection –kitti sisältää peroksidaasiblokkerin, Post Primary Rabbit anti mouse IgG:n, Polymer Anti-rabbit Poly-HRP-IgG:n, DAB-kromogeenin ja hematoksyliinin. Ensin peroksidaasiblokkeri estää endogeenisen peroksidaasitoiminnan. Tämän jälkeen näytteisiin lisätään käyttöön soveltuva spesifinen primaarivasta-aine. Seuraavaksi Post Primary Rabbit anti mouse IgG paikantaa kudoksesta hiiren vasta-aineet ja sen jälkeen Polymer Anti-rabbit Poly-HRP-IgG kanin vasta-aineet. DAB-kromogeenillä saadaan syntynyt vasta-aineiden ja antigeenin muodostama kompleksi visualisoitua ja lopuksi vielä hematoksyliini värjää solujen tumat. (Bond™ Polymer Refine Detection.)

### 3.4 CD-värjäysten laatu

Eri laboratorioissa saattaa olla eroja kudosprosessoinnissa ja teknisessä toteuttamisessa, joten oleellista on saada menetelmät yhdenmukaistettua esimerkiksi ulkoisten laaduntarkkailunäytteiden avulla. Tämä vaatii lisäksi säännöllisiä laboratorion sisäisiä kontroleja jokaiseen työvaiheeseen. Kontrollien tulisi olla puhtaita näytteitä, jotka on fiksoitu formaliinissa, prosessoitu ja valettu parafiiniin mahdollisimman nopeasti samaan tapaan kuin potilasnäytteetkin. (Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD10.)

Positiivisia kontroleja käytetään osoittamaan, että kudospäytteet on oikein valmistettu ja värjäyksessä on käytetty kunnollisia värjäysmenetelmiä. Positiivinen kontrolli tarkoittaa näytettä, jossa on varmasti tutkittavaa antigeeniä, joka varmentaa värjäyksen onnistumisen. Yksi yleisimmin käytetyistä kontrollikudoksista on tonsilla. Tutkittavana olevasta antigeenista kuitenkin riippuu, mitä kudosta kontrollina käytetään, sillä eri kudokset ilmentävät erilaisia antigeeneja. Tällaisen kontrollinäytteen tulisi olla lisättynä jokaiseen prosessin ja värjäyksen vaiheeseen. Optimaaliseen laaduntarkkailuun soveltuvampi kudospäyte on sellainen, jossa todetaan heikko positiivinen värjäytyminen kuin kudospäyte, jossa todetaan vahva positiivinen värjäytyminen. Tällöin pystytään havaitsemaan vähäisemmätkin reagenssien käyttökelpoisuuksien alentumiset. Mikäli kontrollinäytteestä, jossa pitäisi olla positiivista värjäytymistä, ei sellaista todeta, muitakaan värjäyksessä mukana olleita näytteitä ei tule hyväksyä, vaan tulokset tulisi katsoa hylätyiksi. (Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD310.)

Värjäyksessä tulee olla myös mukana negatiivinen kontrolli, jotta voidaan varmentaa kohteena olevan antigeenin leimautumisen spesifisyys primaarivasta-aineella. Laboratorion päätettäväksi jää, mitä kudosta haluaa käyttää, sillä erilaiset solutyypit esiintyvät suurimmassa osassa kudoksia ja tämä tarjoaa useita eri mahdollisuuksia käytettäväksi kontrollikudokseksi. Erityisesti nekroottiset tai hajonneet solut värjäytyvät epäspesifisesti, jolloin se näyttää lasilla epäselvältä. Vääriä positiivisia tuloksia voidaan nähdä epäimmunologisten sidoksien kautta, joissa on mukana proteiinien tai substraattien reaktiotuotteita. Mikäli spesifistä värjäytymistä ilmenee negatiivisessa kuduskontrollissa, värjäyksessä mukana olleita potilasnäytteiden tuloksia ei voida hyväksyä. Negatiivinen kontrolli voi olla myös sellainen, jossa varsinainen vasta-aine on korvattu, jolloin värjäytymistä ei pitäisi esiintyä antigeeniin sitoutuvan vasta-aineen puuttuessa. (Novocastra<sup>TM</sup> Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD10.)

Käyttämällä epätarkkaa negatiivista reagenssia primaarivasta-aineen tilalla jokaisen potilasnäytteen kohdalla, voidaan arvioida epäspesifistä värjäytymistä ja siten saada tulkitua paremmin itse spesifistä värjäytymistä. (Novocastra<sup>TM</sup> Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD10.)

Vasta-aineella leimattu potilasnäyte tutkitaan kontrollinäytteiden hyväksymisen jälkeen. Positiivisen kontrollin värjäytymisen voimakkuus tulisi asettaa kontekstiin negatiivisen reagenssikontrollin epäspesifisen taustavärjäytymisen kanssa, jotta pystytään tulkitsemaan potilasnäytteen tulos. Immunohistokemiassa negatiivinen tulos merkitsee sitä, että antigeeniä ei esiinny tutkittavassa näytteessä, mikäli menetelmän toimivuus on tarkistettu ja kontrollit ovat hyväksytyjä. (Novocastra<sup>TM</sup> Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD10.)



## 4 TUKIMATERIAALIN TEORIA

Päätimme nimetä työelämälle tekemämme materiaalin tukimateriaaliksi, sillä esimerkiksi määritelmä työohje ei siihen täysin sovi. Koska tukimateriaalin teosta ei taustatieto löytynyt, sovelsimme erilaisia ammatilliseen käyttöön tulevien tekstien tuottamiseen liittyviä ohjeita. Käytimme mm. työohjeen tekoon liittyviä ohjeistuksia apunamme niiltä osin, joilta se soveltui tukimateriaalin laatimiseen.

Työelämän käyttöön tulevan tekstin kohderyhmä on otettava huomioon jo suunnittelussa (Kankaanpää & Phiel 2011, 67). Tekstiä suunnitellessa tulisi huomioida myös tekstin tavoite, ydinsisältö ja tyyli (Kankaanpää & Phiel 2011, 31). Ohjeen kielen tulisi olla selkeää ja lukijakunnalle sopivaa. Hyvässä ohjeessa on kaikki tärkeät asiat loogisessa järjestyksessä. Mitään turhaa siihen ei saisi sisällyttää. (Kankaanpää & Phiel 2011, 296–299.) Materiaalimme tulee ammattilaisten käyttöön, joten se sisältää laboratorion ammattisanastoa. Tekstiä sisällytimme hyvin vähän, sillä kuvat ovat pääosassa materiaalia.

Hyvän materiaalin tulee olla kirjallisessa muodossa, ajan tasalla ja johdonmukainen. Se on myös helppokäyttöinen ja helposti työntekijän saatavissa. Lisäksi sen on tuotava lisäarvoa tehtävälle työlle. (Highet 2008.) Materiaalin laatiminen jakautuu eri vaiheisiin. Vaiheet ovat suunnittelu, tiedon kerääminen, kirjoittaminen, palaute sekä tarvittaessa palautteen mukaiset korjaukset. (Iisa, Piehl, Kankaanpää 1999, 15–16.) Liikaa perusasioissa pysyvä ohje jää helposti lukematta, sillä suurin osa asiasta on ennestään tiedossa. (Jussila, Ojanen & Tuominen 2006, 93.)

## 5 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä tukimateriaali CD-värjäyksistä Fimlab Laboratoriot Oy:n patologian osastolle ja sen tavoitteena on tukea värjäysten tekijöitä värjäyslaadun arvioinnin parantamisessa sekä tulkinassa. Tämä materiaali tulee paperiversiona mikroskopoinnin tueksi. Tukimateriaali kokoaa keskeisimmät tiedot CD-värjäyksistä ja siitä voi tarkistaa tarvittaessa positiivisen värjäytyvyyden, mitä värjäys värjää ja miten se värjää.

Opinnäytteemme tehtäviä ovat:

1. Millä periaatteella CD-värjäykset värjäävät?
2. Millaisia värjäystuloksia on odotettavissa kunkin CD-värjäyksen kohdalla?

## 6 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Toiminnallinen opinnäytetyö on kaksiosainen, sillä se sisältää toiminnallisen osuuden ja opinnäytetyöraportin. Toiminnallinen osuus voi olla esimerkiksi opas, kirja tai näyttely. Aihe toiminnalliselle opinnäytetyölle lähtee usein toimeksiantajan tarpeesta ja sen tarkoituksena onkin kehittää ja ohjeistaa työelämän käytännön toimintaa. Toiminnallinen opinnäytetyö pohjautuu vahvasti teoreettiselle perustalle ja tekijöiden tulee perehtyä hyvin kyseisen alan ammattiteoriaan. (Lumme, Leinonen, Leino, Falenius & Sundqvist 2006.) Toiminnallisen opinnäytetyön ideana on luoda jotain uutta ja kohderyhmälle merkityksellistä. (Vilkkä ym. 2004, 26–27.)

Toiminnallinen opinnäytetyö koostuu varsinaisesta tuotoksesta ja sitä tukevasta opinnäytetyöraportista. Raporttiosa kertoo, mitä, miksi ja miten on tehty. Lisäksi siihen sisältyy työprosessin kuvailu, johtopäätöksien esittely sekä oman oppimisen ja koko prosessin arviointi. (Vilkkä & Airaksinen 2004, 65.)

Opinnäytetyömme on toiminnallinen, koska siitä syntyy tuotoksena tukimateriaali. Tuotos on työelämän käytännön työhön tuleva materiaali, jota työntekijät voivat käyttää apunaan mikroskopoinnissa. Raporttiosassa käsittelemme tuotoksen taustaa, eli immunohistokemian, CD-järjestelmän ja tukimateriaalin kirjoittamisen teoriaa. Raporttiosuudessa olemme myös esitelleet työn tarkoituksen, tavoitteen ja tutkimustehtävät, sekä opinnäytetyöprosessin kulun.

## 7 TUOTOS

### 7.1 Tukimateriaalin sisältö

Fimlabille tehtävän tukimateriaalin tehtävänä on olla tukena mikroskoppinnissa, jolloin siitä voisi tarkistaa, miltä positiivisen värjäystuloksen tulisi näyttää. Tärkeimpänä sisältönä on onnistuneet kuvat kustakin värjäyksestä. Kustakin värjäyksestä löytyy myös tiedot taulukon muodossa värjäytyvyydestä, diagnostisesta käytöstä sekä positiivisesta kontrollikudoksesta (taulukko 1.). Lisäksi kerromme yleistä tietoa käytetystä värjäyspaketista ja -automaatista. Varsinaisessa työelämän käyttöön tulevassa materiaalissa kerrotaan kussakin CD-värjäyksessä käytettävän vasta-aineen klooni, mutta tätä tietoa ei saa sisältyä yleiseen julkaisuun päätyvässä versiossa.

TAULUKKO 1. Värjäysten tiedot

Värjäytyminen	
Käyttö	
Positiivinen kontrollikudos	

### 7.2 Tukimateriaalin ulkoasu

Tukimateriaalin ulkoasun pyrimme pitämään yksinkertaisena ja selkeänä. Selkeyden vuoksi taulukoimme kunkin värjäyksen tiedot yksinkertaiseen taulukkoon ja jokainen värjäys kuvineen on omalla sivulla tai aukeamalla. Sivut otsikoitiin aina kyseisessä värjäyksessä käytetyn vasta-aineen mukaan. Fonttina käytimme Times New Romania ja fontin koko oli taulukon otsikoissa 14 pistettä ja tekstiosuudessa 12 pistettä. Lisäksi materiaalissa on Tampereen ammattikorkeakoulun opinnäytetyömallin mukainen kansilehti ja sisällysluettelo.

## 8 OPINNÄYTETYÖPROSESSI

### 8.1 Opinnäytetyön suunnittelu

Toiminnallisen opinnäytetyön suunnitelman tarkoitus on kertoa mitä tehdään, miten tehdään ja miksi tehdään. Lisäksi se osoittaa, että tekijöillä on harkittu idea opinnäytetyön etenemisestä. Suunnitelman yhteydessä olisi hyvä myös tutkia muita aiheeseen liittyviä tutkimuksia, sillä samankaltaista työtä ei ole järkevää tehdä toiseen kertaan. (Vilkkä ym. 2004, 26–27.)

Opinnäytetyön virallinen suunnitelma valmistui ja esitettiin lokakuussa 2014. Tällöin perehdyimme pintapuolisesti aiheemme teoreettisiin ja menetelmällisiin lähtökohtiin, mietimme työn tarkoituksen, tavoitteen ja tutkimustehtävät sekä laadimme alustavan aikataulun opinnäytetyön eri vaiheiden tekemisestä ja valmistumisesta. Suunnitelman pohjalta oli helpompi lähteä itse opinnäytetyöprosessin tekoon, kun oli saanut mielikuvan aiheesta.

Aloittaessamme tukimateriaalin suunnittelun kävimme keskustelemassa materiaalin tilanneen Fimlabin patologian laboratorion yhteyshenkilön kanssa. Näin saimme heti aluksi tietää materiaaliin sisällytettävät tarpeelliset tiedot sekä huomioitavat eettiset näkökohdat. Esimerkiksi meitä sitoo ehdoton salassapitovelvollisuus, sillä mm. värjäyksissä käytettävät kloonit ovat salassa pidettävää tietoa. Näin ollen yleiseen julkaisuun päätyvät tuotokset on ehdottomasti tarkistettava ja mahdolliset Fimlabin käyttöön tulevan tukimateriaalin salassapitoa vaativat tiedot poistettava.

### 8.2 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyömme teko lähti käyntiin opinnäytetyöraportin teoriaosuuden kirjoittamisella. Päädyimme kirjoittamaan teorian ennen tukimateriaalin tekoa, sillä aihealue oli meille melko vieras. Emme tienneet juurikaan immunohistokemian perusteista tai työohjeen teosta, joten näihin oli perehdyttävä aluksi. Lähdemateriaalina käytimme lähinnä englanninkielistä kirjallisuutta, sillä suomeksi materiaalia oli hyvin vähän.

Tukimateriaalin työstämisen aloitimme suunnittelemalla taulukon, johon tuli oleelliset tiedot kustakin vasta-aineesta ja niiden toiminnasta. Lisäksi kirjoitimme lyhyen johdannon, joka kertoo värjäysprosessista ja siinä käytettävästä kitistä sekä laiteesta. Tukimateriaalin tekemisen tärkein vaihe oli värjäyksien kuvaaminen. Kuvat otettiin immunohistokemiallisesti värjäytyistä kontrollikudoksista Fimlab laboratoriot Oy:n patologian laboratorion mikroskooppikameralla.

Teoriaosuuden kirjoittamisessa ja lähdemateriaalin kasaamisessa oli hieman vaikeuksia aluksi ja lopulta kirjoitimme teoriaosuuden hyvin nopealla aikataululla. Varsinaisen tukimateriaalin tekeminen jäi melko myöhäiseen vaiheeseen, sillä teimme sen täysin valmiiksi lokakuussa 2015. Suunnitelmaan laatimamme aikataulu ei näin ollen pitänyt lainkaan. Alkuperäisen aikataulun mukaan koko työn piti olla hiomista vaille valmiina kesällä 2015. Aikataulumme oli optimistinen, mutta se olisi ollut mahdollista toteuttaa.

Tukimateriaalin kuvien hankkiminen osoittautui kaikkein hankalimmaksi osaksi opinnäytetyön tekoa niin kuin aluksi olimme aavistaneet. Koska meillä oli vain vähän kokemusta immunohistokemiallisista värjäyksistä, laadukkaiden kuvien tunnistaminen oli vaikeaa. Myös raporttiosuuden teoretietiedon rajaus oli vaikea kohta, sillä tuli miettiä, mikä laajasta aihealueesta on oleellista lukijalle.

### **8.3 Opinnäytetyön käytettävyyden arviointi**

Oman arvioinnin lisäksi on järkevää pyytää palautetta myös valmiin ohjeen kohderyhmältä. Työohjeen kohdalla käytettävyyden arviointi työelämässä olisi mielekästä. (Vilkkä ym. 2004, 157.) Näin ollen, jotta tukimateriaali olisi mahdollisimman hyödyllinen työelämässä, pohdimme itse sen käytettävyyttä ja luotettavuutta, mutta annoimme sen myös arvioitavaksi opinnäytetyön tilanneelle laboratoriolle. Näiden arviointien pohjalta nousseet puutteet ja korjausehdotukset pyrimme korjaamaan toiveiden mukaisiksi. Annoimme vielä korjatun version arvioitavaksi Fimlab Laboratoriot Oy:n patologian yhteyshenkilöllemme ja tähän versioon oltiin tyytyväisiä. Palautteen mukaan materiaalissa oli tiivistetyt tärkeimmät tiedot ja kuvat olivat informatiivisia sekä laadukkaita. Korjausehdotuksia ei enää tullut.

## 9 POHDINTA

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli tehdä tukimateriaali Fimlab laboratoriot Oy:n patologian laboratoriolle ja sen tavoitteena on parantaa immunohistokemiallisten CD-värjäysten laatua. Tätä materiaalia laboratorion työntekijät voivat hyödyntää tarkastaessaan omia värjäystuloksiaan, sillä he voivat vertailla värjäyksiään positiivisista kontrollikudoksista otettuihin kuviin.

Opinnäytetyön luonteen vuoksi tärkein sisältö tukimateriaalissa oli onnistuneet ja laadukkaat kuvat. Kuvien tuli olla niin hyviä, että työntekijät voivat luottaa niihin omia värjäyksiään tehdessä. Kuvien luotettavuuden takaamiseksi ja materiaalin kokonaiskäytettävyyden arvioimiseksi annoimme valmiin materiaalin Fimlabin patologian laboratoriolle koe-käyttöön. Laboratorion palautteen mukaan korjasimme työssä ilmenneet puutteet ja huomioimme esiintyneet mielipiteet käytettävyydestä. Tuotoksemme arvioivat patologian laboratorion yhteyshenkilömme laboratoriohoitaja Anna-Kaisa Sihvonen ja solubiologi Joanna Ilvesaro. Lopulliseen versioon oltiin tyytyväisiä ja sen katsottiin vastaavan annettuun tehtävänantoon. Itse arvioimme materiaalin olevan tarkoituksen ja tavoitteiden mukainen.

Teoriaosuuden luotettavuuden pyrimme varmistamaan monipuolisilla ja mahdollisimman tuoreilla lähteillä. Osa lähteistä oli hieman liian vanhoja, mutta näitä pyrimme käyttämään avuksi vain perustiedon kirjoittamisessa. Suurin osa lähdemateriaalista oli englanninkielistä. Aihealue oli meille aluksi hyvin vieras ja englanninkielinen lähdemateriaali vaikeutti entisestään immunohistokemian teorian omaksumista. Pyrimme kuitenkin aluksi selventämään tärkeimmät immunohistokemiaan liittyvät termit ja näiden avaaminen helpottikin huomattavasti aiheen ymmärtämistä.

Huomioimme opinnäytetyötä tehdessämme myös laboratorion salassa pidettävät tiedot. Tukimateriaalin julkisessa versiossa ei saa käydä ilmi mitä vasta-aineklooneja laboratoriossa käytetään. Emme myöskään saa itse muilla keinoin tätä tietoa levittää, vaan meitä sitoo tiukasti salassapitovelvollisuus. Emme itse tehneet värjäyksiä, vaan kuvat otettiin valmiiksi värjäytyistä kontrollilaseista. Uskomme tämän parantavan kuvien laatua ja luotettavuutta, kun värjäykset on tehnyt laboratorion työntekijä.

Opinnäytetyön toteutuksessa oli joitakin kohtia, jotka olisimme tehneet toisin. Emme kyenneet pysymään alkuperäisessä aikataulussamme, joten ajankäyttöä voisimme parantaa. Myös alkusuunnitteluun ja tehtävien jakoon panostaisimme nyt enemmän. Hyvän suunnittelun tärkeys korostui useissa vaiheissa, sillä välillä emme tienneet minkä työvaiheen toteutamme seuraavaksi. Suuren osan opinnäytetyön tekoa vietimme eri paikkakunnilla ja koimme tämän opinnäytetyön tekoa vaikeuttavaksi. Emme kuitenkaan opinnäytetyöaiheen saatuamme tienneet tätä seikkaa, joten emme voineet ottaa tätä huomioon suunnitteluvaiheessa ja opinnäytetyön työstämisen alkuvaiheessa.

Opinnäytetyömme sisälsi ainoastaan osan Fimlabin patologian laboratoriossa käytössä olevista CD-vasta-aineista. Laboratoriossa on lisäksi käytössä muunlaisia immunohistokemiallisissa värjäyksissä käytettäviä vasta-aineita. Näin ollen jatkotutkimusaiheena näistä vähemmän käytetyistä CD-vasta-aineista ja muista vasta-aineista voisi tehdä lisämateriaalin.



## LÄHTEET

Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Fifth edition. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders.

A comparison between polyclonal and monoclonal. Key differences, advantages and disadvantages of polyclonal and monoclonal antibodies. Luettu 22.9.2015.  
<http://www.abcam.com/protocols/a-comparison-between-polyclonal-and-monoclonal>

Bancroft, J. D. & Gamble, M. (Ed.) 2008. Theory and Practice of Histological Techniques. Sixth edition. Churchill Livingstone Elsevier.

Basic Concepts in Fluorescence. Luettu 17.4.2015.  
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>

Biotin-Avidin/Streptavidin Systems. Luettu 15.4.2015.  
<https://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=28>

BOND-III Fully Automated IHC and ISH. Leica Biosystems. Luettu 8.10.2015.  
<http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish-fish/advanced-staining-instruments/details/product/leica-bond-iii/>

Bond™ Polymer Refine Detection. Leica Biosystems. Luettu 8.10.2015.  
[http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img\\_uploads/novocastra\\_reagents/Novocastra\\_datasheets/ds9800.pdf](http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/ds9800.pdf)

Buchwalow, I. B. & Böcker, W. 2010. Immunohistochemistry: Basics and methods. Springer.

Cluster of Differentiation (CD). Sino Biological Inc. Luettu 15.4.2015.  
<http://www.sinobiological.com/Cluster-of-Differentiation-Antigen-CD-Antibody-a-251.html>

Highet, D. 2008. Work Instructions That Work. Luettu 20.5.2015.  
[http://www.grizmo.com/management\\_news\\_200810.html](http://www.grizmo.com/management_news_200810.html)

Iisa, K., Piehl, A., Kankaanpää, S., 1999. Tekstintekijän käsikirja. Helsinki: Yrityskirjat Oy.

Introduction to Immunohistochemistry. IHC-World. Luettu 15.4.2015.  
[http://www.ihcworld.com/\\_intro/ihc-methods.htm](http://www.ihcworld.com/_intro/ihc-methods.htm)

Joensuu, H., Roberts, P. J., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkö, S., Kouri, M. & Teppo, L. (toim.) 2013. Syöpätaudit. 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim.  
Kankaanpää, S. & Phiel, A. 2011. Tekstintekijän käsikirja. Opas työssä kirjoittaville. Suomen yrityskirjat Oy.

Jussila, R., Ojanen, E. & Tuominen, T. 2006. Tieto Kirjaksi. Saarijärvi:Saarijärven Offset Oy.

Kiernan, J. A. 1999. Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice. Third edition. Replika Press Pvt.

Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (ed.) 2009. Education Guide, Immunohistochemical (IHC) Staining Methods. Fifth Edition. Dako.

Lal, S., Brown, A., Nguyen, L., Braet, F., Dyer, W. & dos Remedios, C. 2009. Using Antibody Arrays to Detect Microparticles from Acute Coronary Syndrome Patients Based on Cluster of Differentiation (CD) Antigen Expression. US National Library of Medicine, National Institute of Health. Luettu 15.4.2015.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2667358/>

Lumme, R., Leinonen, R., Leino, M., Falenius, M. & Sundqvist, L. 2006. Monimuotoinen / toiminnallinen opinnäytetyö. Luettu 24.8.2015.  
<http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojak-sot/030906/1113558655385/1154602577913/1154670359399/1154756862024.html>

Neukkarinen, A. (Toim.) 2002. Immunohistologian peruskurssi 25.-27.11.2002. 2. painos. Kuopion yliopisto.

Novocastra<sup>TM</sup> Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD10. Leica Microsystems. Datasheet.

Orchard, G. & Nation, B. (Ed.) 2012. Histopathology. Oxford, UK: Oxford University Press.

Overview of Immunohistochemistry. ThermoFisher Scientific. Luettu 15.4.2015.  
<https://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-immunohistochemistry.html>

Renshaw, S. (ed.) 2007. Immunohistochemistry. Oxfordshire: Scion Publishing Limited.

Smith, P. 2015. Immunohistochemistry – direct, indirect and sandwiches. Agar Scientific. Luettu 21.9.2015.  
<http://www.agarscientific.net/immunohistochemistry-direct-indirect-and-sandwiches/>

Suvarna, S. K., Layton, C. & Bancroft, J. D. (ed.) 2013. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Seventh edition. Churchill Livingstone Elsevier.

Vilkka, H. & Airaksinen, T. 2004. Toiminnallinen opinnäytetyö. Jyväskylä: Tammi

