



SAVONIA

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

DNA:N ERISTYS FFPE-KUDOKSESTA

Eristysmenetelmän kehittäminen TMA-laitteella otetuille munuais-
syöpäkudospaloille

TEKIJÄT: Niina Pääkkönen
Annamari Ruotsalainen
Mari Ruuskanen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala		
Koulutusohjelma/Tutkinto-ohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma		
Työn tekijät Pääkkönen Niina, Ruotsalainen Annamari, Ruuskanen Mari		
Työn nimi DNA:n eristys FFPE-kudoksesta – Eristysmenetelmän kehittäminen TMA-laitteella otetuille munuaissyöpäkudospaloille		
Päiväys 26.3.2018	Sivumäärä/Liitteet	49/19
Ohjaajat Anssi Mähönen, Jaana Hartikainen		
Toimeksiantaja Pohjois-Savon Sairaanhoitopiiri/Itä-Suomen Biopankki		
<p>Tiivistelmä</p> <p>Biopankkien hallinnassa olevat kudoksenäytekokoelmat toimivat merkittävänä resurssina lääketieteellisissä tutkimuksissa. Näytteiden säilyttäminen formaliniin fiksoituna ja parafiinilla peitettyinä FFPE-kudoksenäytteinä (formalin-fixed, paraffin embedded) mahdollistaa näytteiden tutkimisen takautuvasti, koska kudoksen rakenne saadaan säilytettyä ennallaan. Näytteiden ja tietoaainestojen avulla voidaan kehittää uudenlaisia lääkkeitä, diagnostisia menetelmiä ja esimerkiksi potilaalle yksilöllisesti sopivia hoitoja, sekä varmistaa niiden toimivuus.</p> <p>Opinnäytetyö oli Itä-Suomen Biopankille tehtävä kehittämistyö, jonka tavoitteena oli kehittää TMA-laitteella otetuille munuaissyöpäkudospaloille toimiva DNA:n eristysmenetelmä. Tarkoituksena oli eristää DNA:ta FFPE-munuaissyöpäkudoksesta ja varmistaa eristetyn DNA:n laatu eli pitoisuus, puhtaus ja eheys. DNA:n eristämistä laadittiin myös työohje, joka jäi Itä-Suomen Biopankin käyttöön tulevia munuaissyöpäkudoksesta tehtäviä DNA:n eristyksiä varten.</p> <p>DNA:n eristyksissä käytetyt näytteet olivat Itä-Suomen Biopankin hallinnassa olevia 13–18 vuotta vanhoja parafiiniin valettuja, formaliniinifiksoituja munuaissyöpäkudoksenäytteitä. Työssä käytettiin QIAGENin GeneRead FFPE -kittiä, joka on tarkoitettu genomisen DNA:n eristämiseksi FFPE-kudoksesta. Näytteet eluoiitiin spin-kolonnista kolme kertaa, jotta varmistuttiin kaiken DNA:n irronneen kolonnin kalvolta. Eristetyn DNA:n pitoisuus ja puhtaus mitattiin mikrovolyymispektrofotometrillä ja eheys geelielektroforeesiin perustuvalla analysaattorilla. DNA:n eristämiseen tarkoitettu työohje laadittiin munuaissyöpäkudosta varten kitin ohjetta mukaillen.</p> <p>Eristettyjen DNA-näytteiden pitoisuudet olivat suurimpia ensimmäisessä eluutiossa, puhtauksien ollessa myös hyväksytyissä raja-arvoissa. Toisessa ja kolmannessa eluutiossa DNA:n pitoisuudet ja puhtaudet laskivat huomattavasti verrattuna ensimmäiseen eluutioon. DNA:n eheys mitattiin ainoastaan ensimmäisen eluution näytteistä. Kolmasosassa näytteistä DNA oli riittävän eheää jatkokäyttöä ajatellen.</p> <p>Johtopäätöksinä voitiin todeta, että FFPE-munuaissyöpäkudoksesta eristetty DNA oli yleisesti ottaen melko pilkkoutunutta. Tuloksista havaittiin, että mitä vanhempi näyte oli, sitä pilkkoutuneempaa siitä eristetty DNA oli. Näytteen pitoisuuteen ja saantoon näytteen iällä ei ollut vaikutusta. Näytteen ottokohdalla, tuumorin keskeltä tai reunasta, ei ollut vaikutusta DNA:n eheyteen eikä sen pitoisuuteen tai puhtauteen.</p>		
Avainsanat biopankki, DNA, DNA:n eristys, FFPE, työohje		

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme in Biomedical Laboratory Science			
Authors Pääkkönen Niina, Ruotsalainen Annamari, Ruuskanen Mari			
Title of Thesis Isolation of DNA from FFPE-tissues – Developing a DNA isolation method for kidney cancer samples			
Date	26.3.2018	Pages/Appendices	49/19
Supervisors Anssi Mähönen, Jaana Hartikainen			
Client Organisation Pohjois-Savon Sairaanhoidopiiri/Biobank of Eastern Finland			
<p>Abstract</p> <p>Biobanks have collections of tissue samples that are a major resource in medical research. Preservation of tissues in FFPE blocks (formalin-fixed, paraffin embedded) allows the tissues to be retrospectively studied because the tissue structure remains unchanged. Samples and sample data can be used to develop novel drugs, diagnostic methods and customized treatments for patients and to ensure their functionality.</p> <p>This thesis was a development work for the Biobank of Eastern Finland that had an aim to develop a DNA isolation method for the tissue samples taken out of kidney cancer specimens with a TMA-device. The purpose of the thesis was to extract DNA from FFPE-kidney cancer tissue and to ensure the quality of the extracted DNA; i.e. its concentration, purity and integrity. The protocol for the DNA isolation was also developed to be used in the Biobank of Eastern Finland in future DNA isolations from kidney cancer samples.</p> <p>The samples used in DNA isolation were 13-18 years old FFPE kidney cancer samples from the Biobank of Eastern Finland. The QIAGEN GeneRead FFPE kit that is designed for purification of genomic DNA from FFPE tissues, was used for the isolation of DNA. The DNA was eluted three times from the isolation column to make sure that all of the DNA had been removed from the silica membrane of the column. The concentration and purity of the extracted DNA was determined by a spectrophotometer and the integrity by a gel electrophoresis-based analyzer. The isolation protocol for genomic DNA was prepared for the kidney tissue, in line with the kit's instructions.</p> <p>The concentration of the extracted DNA was highest in the first elution, with purities also at acceptable limits. In the second and third elution the DNA concentration and purity decreased considerably compared to the first elution. The integrity of the extracted DNA was determined only from the first elution. One third of the samples had enough intact DNA for further use.</p> <p>In conclusion, it was found that genomic DNA extracted from FFPE kidney cancer tissues was generally quite fragmented. It was observed that the age of the sample had effect on the fragmentation of the isolated DNA; DNA from older tissue was more fragmented than DNA from younger tissue. The age of the sample had no effect on the concentration and the yield of the isolated DNA. It was also observed that the site of the sample (taken from the center or the edge of tumor) had no effect on concentration, purity or integrity of DNA.</p>			
<p>Keywords biobank, DNA, isolation of DNA, FFPE, work instruction</p>			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	BIOPANKKI	8
2.1	Biopankkilaki	8
2.2	Näytteenantajan oikeudet ja tietosuoja	8
2.3	Näytteiden käyttö	9
2.4	Biopankkien merkitys tutkimustyölle.....	10
3	MUNUAISSYÖPÄ JA DIAGNOSTISET KUDOSNÄYTTEET	11
3.1	Munuaissyöpä.....	11
3.1.1	Oireet ja diagnostiikka	11
3.1.2	Hoito ja ennuste	12
3.2	Diagnostiset kudoksenäytteet.....	12
3.2.1	FFPE-kudoksenäytteen valmistaminen patologian laboratoriossa.....	13
3.2.2	Monikudoksenblokit	14
3.2.3	DNA:n säilyvyys FFPE-kudoksenäytteissä	14
4	DNA	16
4.1	Genomisen DNA:n eristys	16
4.2	DNA:n pitoisuus ja puhtaus	17
4.3	DNA:n eheys	18
5	TYÖN TAVOITE JA TARKOITUS.....	21
5.1	Kehittämistyö	21
5.2	Hyvä työohje	21
6	TYÖN TOTEUTUS	23
6.1	Työssä käytetyt näytteet	23
6.2	DNA:n eristys QIAGEN GeneRead DNA FFPE -kitillä.....	23
6.3	DNA:n pitoisuuden ja puhtauden mittaaminen	25
6.4	DNA:n eheyden mittaaminen	26
6.5	Tulosten dokumentointi.....	27
7	TYÖN TULOKSET	28
7.1	Eristetyn DNA:n pitoisuus ja saanto	28
7.1.1	Pitoisuus ja saanto Proteinase K -inkubointiajan mukaan	30
7.1.2	Pitoisuus ja saanto näytteenottokohdan ja näytteen iän mukaan	30

7.2	Eristetyn DNA:n puhtaus	32
7.3	Eristetyn DNA:n eheys	33
7.3.1	DNA:n eheys Proteinase K -inkubointiajan mukaan.....	34
7.3.2	DNA:n eheys näytteenottokohdan ja näytteen iän mukaan	36
8	POHDINTA.....	39
8.1	Opinnäytetyön vaiheet	39
8.2	Laboratoriotyöskentely	39
8.3	Tulokset	40
8.3.1	DNA:n eristyksen tulokset.....	40
8.3.2	Työohje.....	41
8.4	Tulosten luotettavuus.....	41
8.5	Opinnäytetyön merkitys ja jatkotutkimusmahdollisuudet.....	42
8.6	Opinnäytetyöhön liittyvät eettiset kysymykset.....	43
8.7	Oman työskentelyn ja oppimisen arviointi.....	43
LÄHTEET	VIRHE. KIRJANMERKKIÄ EI OLE MÄÄRITETTY.	
LIITE 1: TYÖOHJE GENOMISEN DNA:N ERISTÄMISEKSI FFPE-MUNUAISSYÖPÄKUDOKSESTA QIAGEN GENEREAD DNA FFPE -KITILLÄ	VIRHE. KIRJANMERKKIÄ EI OLE MÄÄRITETTY.	
LIITE 2: MITTAUSTULOKSET	VIRHE. KIRJANMERKKIÄ EI OLE MÄÄRITETTY.	



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

Vipuvoimaa
EU:lta
2014–2020

Sanasto

Absorbanssi = Optinen tiheys, valon imeytymistä aineeseen kuvaava luku

DIN = DNA:n eheyttä kuvaava arvo, DNA Integrity Number

Dissekointi = Kudosnäytteen pilkkominen

DNA = Deoksiribonukleiinihappo, perintöainesta, sisältää muun muassa geenit

DNA:n sekvensointi = DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen

Eluointi = Uuttaminen, ainesosan irrottaminen soveltuvalla liuottimella

Emäspari = DNA:ssa vastakkaisten emästen muodostama pari, DNA-juosteen pituus ilmoitetaan emäsparien lukumääränä

FFPE = Formaliinilla fiksoitu, parafiinilla peitetty (formalin-fixed, paraffin-embedded)

Fiksointi = Kudosnäytteen kiinnittäminen formaliinilla

Fragmentti = Katkelma, palanen, DNA:ssa lyhyt jakso juosteesta

Geeni = DNA:n emäsjakso, joka toimii ohjeena RNA:n valmistamiseen

Genominen DNA = Kromosomeiksi pakkautunut DNA

NGS = Uuden sukupolven sekvensointi, Next Generation Sequencing

Nukleotidi = Nukleiinihappojen rakenneyksikkö, koostuu emäksestä, sokeriosasta ja fosfaatista

Proteinase K = Proteiineja hajottava entsyymi, proteinaasi K

Spin-kolonne = Nukleiinihappoja sitovan silikakalvon sisältävä pylväs

TMA = Kudossiru-tekniikka (tissue micro array)

1 JOHDANTO

Suomalaisista joka kolmas tulee sairastumaan syöpään jossain vaiheessa elämäänsä (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2014). Yhä useampi syöpään sairastuneista paranee, sillä hoitotulokset ovat parantuneet syöpähoitojen kehittyessä tehokkaammiksi ja tarkemmin kohdennetuiksi (Syöpäjärjestöt 2017). Korkealaatuiset ihmisperäiset näytteet ovat avainasemassa syöpätutkimuksessa ja uusien hoitojen kehittämisessä. Tutkimuksia varten voi kuitenkin olla haasteellista löytää tarpeeksi laajoja aineistoja tuoreita kudospäätteitä. Tästä syystä FFPE-kudospäätteiden, eli formaliinilla fiksoitujen ja parafiiniin valettujen kudospäätteiden (formalin-fixed paraffin-embedded) ja niistä eristetyn DNA:n ja RNA:n käyttö on lisääntynyt syöpätutkimuksissa. (Doiron 2014.)

Biopankeissa säilötään laajoja ihmisperäisiä näytekokoelmia terveystieteellisiä tutkimuksia varten (Auria Biopankki 2017). Biopankit ovat merkittävässä asemassa uusia hoitomuotoja ja lääkkeitä kehitettäessä, sillä ne pystyvät tarjoamaan riittävän suuria näyte- ja tietoaaineistoja kliinisen tutkimuksen käyttöön (Suomen Biopankit 2017b). Näytekokoelmien avulla pystytään tutkimaan tekijöitä, jotka ovat vaikuttaneet sairauksien syntyyn sekä kehittämään parempia lääkkeitä, hoitoja ja taudinmääritysmenetelmiä (Auria Biopankki 2017). Esimerkiksi Itä-Suomen Biopankilla on hallinnassaan 250 000 kudospäätettä vuosilta 2000–2013, mikä mahdollistaa laajojakin tutkimuksia (Itä-Suomen Biopankki 2017c).

Saimme toimeksiannon opinnäytetyöllemme Itä-Suomen Biopankilta, ja se on tehty osana Itä-Suomen biopankkikosysteemi hanketta (A73545). Työ on kehittämistyö, jonka tavoitteena on kehittää TMA- eli tissue microarray -laitteella otetuille FFPE-munuaissyöpäkudospaloille toimiva DNA:n eristysmenetelmä. Opinnäytetyömme tarkoitus on eristää genomista DNA:ta FFPE-munuaissyöpäkudospäätteistä ja varmistaa niiden laatu: puhtaus ja pitoisuus mikrovolyymispektrofotometrillä ja eheys geelielektroforeesiin perustuvalla analysaattorilla. Tarkoituksena on laatia DNA:n eristämistä työhohje, joka jää Itä-Suomen Biopankin käyttöön tulevia munuaissyöpäkudoksesta tehtäviä DNA:n eristyksiä varten. Lisäksi Itä-Suomen Biopankki saa haltuunsa työn aikana FFPE-munuaissyöpäkudoksesta eristämämme DNA-näytteet, joita voidaan hyödyntää tutkimuskäytössä.

2 BIOPANKKI

Biopankit säilyttävät ihmisperäisten veri- ja kudoksenäytteiden ja niihin liittyvän tiedon kokoelmaa terveystieteellisiä tutkimuksia varten. Biopankkien näytekokoelmat toimivat merkittävänä resurssina lääketieteellisissä tutkimuksissa. Näytteiden ja tietoa-aineistojen avulla voidaan kehittää uudenlaisia diagnostisia menetelmiä, sekä varmistaa niiden toimivuus. Aineistoja voidaan käyttää myös kehitettäessä potilaille yksilöllisesti sopivia hoitoja. Hoitojen ja lääkkeiden tehokkuus on yksilöllistä ja myös syöpätyyppejä on lukuisia erilaisia, joten parhaiten tehoavan hoidon löytäminen on tärkeää. (Kääriäinen ja Soini 2015a; Suomen Biopankit 2017b.)

2.1 Biopankkilaki

Tämän hetkinen Biopankkilaki on astunut voimaan 1.9.2013 ja sen tarkoituksena on turvata näytteenantajan yksityisyyttä ja itsemääräämisoikeutta, mutta myös edistää näytteiden käytön avoimuutta ja tällä tavoin tukea tutkimusta. Laissa on säädetty biopankin perustamiseen ja toiminnan harjoittamiseen liittyvistä vaatimuksista, näytteiden keräämisestä ja säilyttämisestä, sekä siihen liittyvästä valvonnasta. Laki määrittelee myös näytteiden antajien oikeudet ja järjestelyt, joilla tietosuoja voidaan varmistaa. (Biopankkilaki 2012, § 1.)

Laissa on määritelty tarkasti, mitä biopankilla tarkoitetaan ja myös näyte ja siihen liittyvät käsitteet on kuvattu tarkoin. Näyte on ihmisperäistä materiaalia tai siihen liittyvä tekninen tallenne. Näytteet jaetaan tunnistetuksi, koodattuihin ja tunnistettomiin näytteisiin. Tunnistettu näyte tarkoittaa, että siihen on liitetty henkilön yksilöivä tieto tai siihen voidaan palauttaa yksilöivää tietoa. Koodattu näyte ei sisällä henkilön yksilöivää tietoa, vaan yhteys henkilöön tai näytettä koskevaan tietoon merkitään yksilöllisellä tunnisteella. Koodattuna voidaan yhdistää yksilöivä tunnistettu luonnolliseen henkilöön. Tunnisteton näyte tarkoittaa näytettä, joka ei sisällä yksilöivää tietoa tai yhteys tietoon on katkaistu pysyvästi. (Biopankkilaki 2012, § 2–3.)

2.2 Näytteenantajan oikeudet ja tietosuoja

Jokaisella suomalaisella on oikeus luovuttaa näytteitä biopankkiin ja se on vapaaehtoista. Huoltajat voivat antaa alaikäisen suostumuksen hänen puolestaan. Sairaalakäynnillä tai väestötutkimuksessa asiakkaalle annetaan tietoa biopankkitoiminnasta ja tietosuojasta ja kysytään, haluaako hän antaa näytteen biopankkiin. Näyte voi olla esimerkiksi kudoksen- tai verinäyte. Näyte otetaan sairaalakäynnin tai tutkimuksen yhteydessä ilman, että asiakkaalle tulee lisävaivaa. Biopankkiin on mahdollista siirtää myös vanhoja näytteitä, joiden kerääminen on tapahtunut ennen 1.9.2013. Vanhojen näytteiden siirtoon tarvitaan alueellisen eettisen toimikunnan ja Valviran hyväksyntä. (Suomen Biopankit 2017c.)

Näytteenantajalla on oikeus tietää, missä hänestä otettuja näytteitä säilytetään, missä tutkimuksissa niitä on käytetty ja millaista tietoa tutkimuksista saatiin ja onko tiedolla vaikutusta näytteenantajan

sairauden hoitoon. Näytteenantaja saa itse valita, haluaako hän tietoa, jos biopankkitutkimuksen löydöksellä on vaikutusta hänen terveyteensä. (Suomen Biopankit 2017c.)

Biopankkiin annettu suostumus on mahdollista myös perua. Ennen biopankkien perustamista otettujen näytteiden osalta koko siirto on mahdollista kieltää, mutta kiello näytteen käytöstä on mahdollista tehdä myös siirron jo tapahduttua. Suostumuksen peruuttaminen tai rajoittaminen tehdään kirjallisesti, eikä syytä siihen tarvitse ilmoittaa. (Suomen Biopankit 2017c.)

Biopankkiin näytteiden antaneiden tietosuojat on korkealla tasolla. Tutkijat eivät käytä aineistoja, joista näytteenantajan henkilöllisyys selviäisi, vaan näytteet on koodattu viivakoodilla ja/tai tutkimuskoodilla. Perustelluista syistä näytteitä voidaan luovuttaa myös tunnisteellisinä, esimerkiksi kun tutkijan on tarpeellista yhdistää aikaisempia tietoja näytteisiin. Näytteenantajan henkilötietoja säilytetään koodirekisterissä, joka on erillään näytteistä ja luovuttajan tiedoista. Koodirekisteriin pääsy on rajoitettua. Biopankit noudattavat tiedonhallinnassaan henkilötietolakia. 25.5.2018 tulee voimaan EU:n yleinen tietosuojasetus, joka koskee myös biopankkeja. (Itä-Suomen Biopankki 2017a; Suomen Biopankit 2017c; Tietosuojavaltuutetun toimisto 2017.)

2.3 Näytteiden käyttö

Biopankit voivat luovuttaa näyteaineistojaan tutkimuksiin, joissa tavoitteena ovat terveyden edistäminen ja sairauksien syiden tutkiminen. Jokaisella Suomen biopankilla on lisäksi omia painopistealueita, joiden tutkimukseen biopankki keskittyy (Suomen Biopankit 2017a). Näyteaineistoja haluavan tutkijan on oltava pätevä sekä ammatillisesti että tieteellisesti ja hänen on noudatettava toiminnassaan biopankin sääntöjä sekä lakia. Tutkijan on tehtävä biopankille luovutuspyyntö, joka sisältää tutkimussuunnitelman, selvityksen tietojen ja näytteiden käsittelystä sekä tutkimuseettisen lautakunnan lausunnon tai muun eettisen selvityksen. Luovutuspyynnön perusteella arvioidaan edellytyksiä näytteiden luovutukselle. Biopankkilain mukaan kaikkien tutkijoiden on saatava biopankin näyteaineistoja käyttöönsä samoin perustein. Pääsyä aineistoihin voidaan rajoittaa laissa mainittujen tai etukäteen biopankin itsensä listaamien kriteerien, esimerkiksi painopistealueiden pohjalta. (Kääriäinen ja Soini 2015a; Kääriäinen ja Soini 2015b.)

Luovutettavat näytteet koodataan siten, ettei näytteitä tai tietoja pystytä yksilöimään. Näytetietojen yhdistäminen rekisteritietoihin on mahdollista tarpeen niin vaatiessa. Näissä tilanteissa rekisterinpitäjä hoitaa yhdistämisen ja ennen tietojen luovutusta tutkimuksesta vastaavalle taholle, koodaa tiedot koodilla, jotka ovat hankekohtaisia. (Kääriäinen ja Soini 2015a.) Tutkija on velvollinen luovuttamaan biopankille tutkimuksessa saatavat näytekohtaiset tutkimustulokset ja nämä uudet tulokset liitetään biopankissa näytteisiin. Näytteitä ja niistä saatuja tutkimustietoja voidaan käyttää edelleen uusissa tutkimuksissa. (Itä-Suomen Biopankki 2017b.) Biopankkien tulee säännöllisesti, vähintään kymmenen vuoden välein, arvioida tarvetta näytteiden ja niihin liittyvien tietojen säilyttämiseen. Näytteet, jotka ovat tarpeettomia biopankin tutkimusalueen kannalta, hävitetään. (Biopankkilaki 2012, § 25.)

2.4 Biopankkien merkitys tutkimustyölle

Biopankkien näytteet ovat tärkeä materiaali lääketieteellisessä tutkimuksessa, niitä on käytetty esimerkiksi sairauksien syntymekanismien selvittämisessä ja uusien hoitomenetelmien kehittämisessä kuten yksilöllisten lääkkeiden kehitystyöhön. Esimerkiksi rinta- ja keuhkosityöpähoitoissa on jo kehitetty geenitestaukseen perustuvaa yksilöllä räätälöityjä hoitoja. Lisää vastaavia mahdollisuuksia voidaan löytää biopankkitutkimuksen avulla. (Bäckström ja Vesterinen 2017.) Esimerkiksi Auria Biopankin näyteaineistoja käytettiin tutkimuksessa, jossa selvitettiin kohonneiden leukosyyttiarvojen vaikutusta polysytemia veraa sairastavien potilaiden terveydenhuollon resurssien käyttöön, kustannuksiin ja potilaiden tautitaakkaan. Tutkimus tehtiin yhteistyössä Auria Biopankin, Turun yliopiston, Turun yliopistollisen sairaalan sekä terveysalan yritysten kesken. Auria Biopankki tarjosi tutkimusta varten niin sanottua Real World Dataa polysytemia veraa sairastavista potilaista, joiden valkosoluarvot olivat kohonneet. Real World Datalla tarkoitetaan kliinisten tutkimusten ulkopuolelta saatua tietoa potilaista, jota hänen henkilötunnuksensa alta löytyy eri tietojärjestelmistä. Tutkimuksessa selvisi, että polysytemia veraa sairastavilla potilailla kohonneet leukosyyttiarvot liittyvät suurempaan kuolleisuuteen, lisääntyneeseen terveydenhuollon resurssien käyttöön ja kustannuksiin, myelofibroottisiin muutoksiin ja tromboembolisiin komplikaatioihin. (Kosunen 2017; Medaffcon 2017.)

”Itä-Suomen Biopankki tukee etenkin verenkierto-, aineenvaihdunta, tuki- ja liikuntaelimestön-, neurologisten- ja syöpäsairauksien sekä mielenterveyden tutkimusta. Sen tehtävänä on edistää terveystieteellistä, biolääketieteellistä, kliinistä, henkilökohtaisen lääketieteen ja niitä niveltävää tutkimusta sekä tautien ennaltaehkäisyä, diagnostiikkaa ja hoidon ja vaikuttavuuden kehitystä.” (Suomen Biopankit 2017a.) Ensimmäisessä Itä-Suomen Biopankin biopankkitutkimuksessa *Hyaluronan metabolism in kidney cancer (HARCC)* urologian erikoislääkäri Timo Nykopp tutkii hyaluronaaniaineenvaihdunnan vaikutusta munuaissyövässä. Biopankki antaa tutkimuksen käyttöön 400 potilaan aineiston. (Itä-Suomen Yliopisto 2017.)

3 MUNUAISSYÖPÄ JA DIAGNOSTISET KUDOSNÄYTTEET

3.1 Munuaissyöpä

Uusia munuaissyöpätapauksia todettiin Suomessa vuosina 2010–2014 keskimäärin 908 henkilöllä vuodessa, joista yli 500 todettiin miehillä ja alle 400 naisilla (Nordcan 2016). Tämä on 2–3 prosenttia kaikista aikuisilla esiintyvistä syövästä ja tilastojen mukaan munuaissyöpä on yleistymässä. Etenkin pienten, alle neljän senttimetrin kokoisten munuaiskasvainien esiintyvyys on ollut kasvussa viime vuosikymmenten aikana. Osa pienistä kasvaimista on hyvin hidaskasvuisia, jolloin niillä ei ole vaikutusta potilaan ennusteeseen. Valtaosa niistä on kuitenkin syöpiä. Suurin riskitekijä on tupakointi, jonka lisäksi korkea verenpaine, lihavuus ja perinnölliset tekijät lisäävät riskiä. Myös pitkälle edennyt munuaisten vajaatoiminta saattaa lisätä munuaissyöpään sairastumisen riskiä. Useilla potilailla ei kuitenkaan ole tunnetuista riskitekijöistä ainuttakaan. Ravinnon merkitystä sairastuvuuteen on tutkittu ja joidenkin tutkimusten mukaan sairastumisriski pienenee jonkin verran, kun ruokavalio sisältää hedelmiä ja vihanneksia. (Bono, Joensuu, Rintala ja Bostöm 2013; Järvinen, Taasi, Nisén ja Kilpeläinen 2016.)

Noin 2–3 prosenttia munuaissyövästä on perinnöllisiä. Yleisin vallitsevasti periytyvä oireyhtymä, johon liittyy suuri, noin 50 prosentin suuruinen munuaissyöpäriski, on von Hippel-Lindaun (VHL) oireyhtymä, jonka aiheuttavat mutaatiot VHL-geenissä. Toinen perinnöllinen munuaissyöpään liittyvä oireyhtymä on leiomyomatoosi, jonka taustalla ovat fumaraasientsyymiä koodaavan fumaraattihydraataasi (FH) -geenin virheet. Tämä aiheuttaa noin 20 prosentille geenivirheen kantajista munuaissyövän. Muita harvinaisia munuaissyövän taustalla olevia oireyhtymiä ovat Birt-Hogg-Dubén -oireyhtymä, sekä hyperparatyroidismi ja leukatuumorit -oireyhtymä. (Aittomäki, Kääriäinen, Mecklin ja Palva 2013; Kiuru 2002.)

3.1.1 Oireet ja diagnostiikka

Tyypillisiä oireita munuaissyövässä ovat laihtuminen, verivirtsaisuus, kylkikipu ja kuumeilu. Veren esiintyminen virtsassa johtuu kasvaimen tunkeutumisesta munuaisaltaaseen ja kipua aiheuttaa munuaista ympäröivän kapselin venymisestä tai kasvaimen tunkeutumisesta ympärillä oleviin kudoksiin. Oireiden perusteella löydetään vain noin 10 prosenttia munuaissyövästä, sillä suurin osa löydöksistä tehdään sattumalta, muusta syystä tehtävän vatsan ultraäänikuvauksen yhteydessä. Nykyään jopa 50–70 prosenttia munuaissyövästä on sattumalöydöksiä. Munuaissyöpä aiheuttaa hypersedimenttaatiota, eli kohonnutta lasko-arvoa, mikroskooppista verivirtsaisuutta sekä anemiaa. Noin 90 prosenttia kaikista munuaissyövästä on tyypiltään adenokarsinoomaa. (Javanainen 2016; Järvinen ym. 2016; Raitanen 2016.)

Munuaissyöpää epäiltäessä tehdään yleensä vatsan kaikukuvaus. Tämän lisäksi voidaan tehdä useita laboratoriotutkimuksia, kuten lasko, perusverenkuva, kreatiniini, alkalinen fosfataasi sekä virtsan kemiallinen seula. Kasvaimen sijainti, koko ja toisen munuaisen kunto varmistetaan tietokonetomografialla. Kuvauksella voidaan arvioida myös mahdollinen leviäminen lähellä oleviin elimiin. Kuvan-

tamisella ei voida todeta kasvaimen hyvän- tai pahanlaatuisuutta, joten ennen syöpähoitojen aloittamista kasvaimesta otetaan biopsianäyte, josta tehdään histologinen tutkimus. (Järvinen ym. 2016; Raitanen 2016.)

3.1.2 Hoito ja ennuste

Ainoa parantava hoito munuaissyöpään on leikkaus. Usein munuainen sekä ympärillä oleva rasva, lisämunuainen ja imusolmukkeet poistetaan kokonaan, mutta munuaiskudosta säästävät osapoisto-leikkaukset ovat yleistyneet viime vuosina. Leikkausmenetelmä valitaan siten, että mahdollisimman paljon toimivaa munuaiskudosta saadaan säästettyä. Lääkehoito aloitetaan leikkauksen jälkeen, jos syöpäkudosta ei saada poistettua kokonaan. Mikäli leikkaus ei ole mahdollinen aloitetaan suoraan lääkehoito. Lisäksi leikkaushoitoon liittyy kroonisen munuaisten vajaatoiminnan riski, joten pienten ja hitaasti kasvavien munuaiskasvainien kohdalla voidaan mahdollisuuksien mukaan välttää leikkaus kokonaan, jolloin kasvaimen tilaa seurataan aktiivisesti. Metastasoitunutta eli etäpesäkkeitä tehnyttä munuaissyöpää hoidetaan oireenmukaisesti. Sädehoidon ei katsota parantavan hoitotuloksia, eikä pidentävän elinajanodotetta, joten sitä käytetään lähinnä oireiden hoitoon. (Javanainen 2016; Järvinen ym. 2016; Raitanen 2016.)

Munuaissyöpäpotilaista noin 80 prosenttia on elossa vuoden kuluttua diagnoosista ja noin 60 prosenttia viiden vuoden kuluttua (Nordcan 2016). Ennusteeseen vaikuttavat muun muassa levinneisyys- ja erilaistumisaste. Mikäli kasvain on ollut paikallinen, eikä se ole metastasoitunut, lähes kaikki ovat elossa viiden vuoden kuluttua diagnoosista. Uusilla lääkkehoidoilla on voitu parantaa myös etäpesäkkeitä lähettäneen syövän ennustetta. Taudin uusiutumista suurin osa tulee ilmi viiden vuoden seurantajakson aikana. (Javanainen 2016.)

3.2 Diagnostiset kudosnäytteet

Diagnostinen tarkoittaa ”diagnoosiin tähtäävä, diagnoosiin kuuluva; diagnoosin kannalta ratkaiseva oire tai löydös” (Duodecim 2007). Diagnostinen näyte voi olla esimerkiksi koepala, jonka avulla halutaan diagnosoida muutoksia tai erottaa kaksi sairautta toisistaan, esimerkiksi sieni-infektio ihottumasta. Diagnostinen kudosnäyte otetaan, kun kudoksesta saatava tieto on jatkohoidon tai operatiivisen hoidon valinnan kannalta merkityksellistä. (Mäkinen 2012a.)

Patologian laboratoriossa tutkittavien diagnostisten kudosnäytteiden kirjo on laaja. Näytteet jaetaan pieniin ja suuriin operatiivisiin näytteisiin. Pieniä operatiivisia näytteitä ovat muun muassa luomet, mutta myös joidenkin syvien kirurgisten näytteiden katsotaan kuuluvan pieniin operatiivisiin näytteisiin. Suuriin operatiivisiin näytteisiin kuuluvat esimerkiksi sairauksien vuoksi poistetut elimet ja niiden osat. Näin ollen koepalat voivat painaa milligrammoista kymmeneen grammiin. Laboratorioon toimitetusta materiaalista kuitenkin vain pieni osa päätyy lopulliseen tutkimukseen. Sen vuoksi lähtävän lääkärin antamilla esitiedoilla, kuten anatomisella suunnalla ja poistomarginaalilla, on suuri merkitys patologin työlle. Kudosnäytteestä saatava diagnoosi on riippuvainen näytteen edustavuudesta.

Jos kudoksenäytteestä saatu vastaus ja kliininen löydös ovat ristiriitaisia, tarvitaan lisätutkimuksia. (Mäkinen 2012a.)

3.2.1 FFPE-kudoksenäytteen valmistaminen patologian laboratoriossa

Laboratorioon saapuvan kudoksenäytteen koko määrittää sen käsittelyn laboratoriossa (kuvio 1). Pienet koepalat voidaan laittaa suoraan näytekasettiin, kun taas suuremmat näytteet vaativat käyntiinpanon. Käyntiinpanossa patologi tutustuu näytteeseen tarkastelemalla sitä silmämääräisesti ja ottaa siitä edustavat viipaleet näytekasetteihin. Näyte dokumentoidaan kuvaamalla tai piirtämällä ja kirjoittamalla niin tarkasti, että näytteen tietoihin voidaan jälkepäin palata luotettavasti. Esikäsittelyn jälkeen näytekasetit siirretään automatisoituun kuduskuljettimeen, jossa kudoksista poistetaan vesi ja rasva, jolloin näytteet saadaan säilymään ja kudusrakenteet kovettettua. Lopuksi kudokset peitetään parafiinilla, joka kovettuu kudosten ympärille ja sisään jäätyessään ja näin mahdollistaa leikkeiden tekemisen. (Mäkinen 2012b.) Näin valmistettuja kudoksenäytteitä kutsutaan FFPE-kudoksenäytteiksi (formalin-fixed paraffin-embedded) (McDade Walker 2013).



KUVIO 1. FFPE-kudoksen valmistelu patologian laboratoriossa (mukaillen Mäkinen 2012b.)

Parafiinipeiton jälkeen kudoksista voidaan leikata 2–5 µm paksuisia leikkeitä, jotka kiinnitetään näytelasille. Kiinnityksen jälkeen näytteet värjätään. Suomessa käytetyin värjäysmenetelmä on hematoksyliini-eosiini-värjäys, jossa hematoksyliini tuo esille tumarakenteen ja eosini värjää solun sisäiset ja ulkoiset proteiinit. (Mäkinen 2012b.) Munuaisbiopsioiden diagnostiikassa käytetään kuitenkin usein erikoisvärjäksiä, joita esimerkiksi ovat PAS (Periodic Acid-Schiff) -värjäys ja AFOG (Acid Fuchsin Orange G) -värjäys (Fimlab 2016; Finto 2015; Helin 2012).

3.2.2 Monikudosblokit

FFPE-kudosnäytteistä voidaan valmistaa monikudosblokkeja, joihin on kerätty satojen, jopa tuhannen potilaan näytteet. Kudosnäytteistä otetaan halutuista kohdista biopsianeulalla sylinterimäiset näytteet, eli puntsit, jotka sijoitetaan tyhjiin parafiiniblockiin. Tästä parafiiniblokista, eli monikudosblokkista voidaan valmistaa kudossiru leikkaamalla siitä 4–5 µm paksuinen leike, joka asetetaan lasille. Kudossiru-, eli TMA (tissue microarray) -tekniikalla pystytään samanaikaisesti tutkimaan satoja näytteitä. TMA-tekniikkaa hyödynnetään esimerkiksi syövän molekyyli tutkimuksissa, sillä sen avulla voidaan tutkia suurella mittakaavalla esimerkiksi tiettyjä geenejä tai proteiineja ja niiden merkitystä syövän kehittymisessä. Kudossirut voidaan värjätä histokemiallisilla tai immunohistokemiallisilla menetelmillä ja kudossirulle voidaan tehdä myös fluoresenssi *in situ* -hybridisaatioanalyysi geeni-, locus- tai kromosomispesifisellä koettimella. (Knuutila 2012; Visapää 2003.)

Kudosnäytteistä voidaan ottaa kudospaloja, eli puntseja, manuaalisesti tai käyttämällä TMA-laitetta. TMA-laitteet voivat olla täysin automatisoituja, tietokoneella ohjattavia tai puoliautomaattisia. TMA-laitetta voidaan käyttää monikudosblokkien valmistuksen lisäksi myös näytteenpoimijana DNA-eristystä varten. Itä-Suomen Biopankilla on käytössään Isenetin valmistama Galileo CK4500 TMA-laitte, jolla voidaan ottaa FFPE-kudosnäytteistä halkaisijaltaan 0,6–2,0 mm kudospaloja. (Isenet 2017; Talvinen 2010.)

3.2.3 DNA:n säilyvyys FFPE-kudosnäytteissä

Formaliinifiksaatiolla saadaan säilytettyä näytteen kudosis- ja solurakenne ennallaan siten, että näytteitä voidaan tarkastella myöhemmin esimerkiksi patologisissa ja immunohistokemiallisissa tutkimuksissa. FFPE-käsittelyjen kudosten etuina ovat muun muassa kudosten helppo käytettävyys ja pitkäkestoisen varastoinnin edullisuus. Fiksointiprosessi kuitenkin vaurioittaa DNA:ta, ja saa sen pilkkoutumaan. (Ludyga ym. 2012.) FFPE-kudoksista eristettyjen nukleiinihappojen laatuun vaikuttavat esimerkiksi kudoksen laatu, fiksaation kesto, fiksatiivin konsentraatio ja pH-arvo. Kuduskuljetus aiheuttaa lisäksi ristiinsitoutumista nukleiinihappoissa ja proteiineissa, mikä omalta osaltaan myös johtaa DNA:n rakenteen hajoamiseen. FFPE-näytteistä eristetyt nukleiinihapot sisältävätkin yleensä alle 3000 emäsparin pituisia, eli normaalia pienempiä fragmentteja. (Ludgate ym. 2017.)

Bass, Engel, Greytak ja Moore (2014) selvittivät kirjallisuuskatsauksessaan, kuinka formaliinifiksatioon ja parafiinipeittoon liittyvät preanalyttiset tekijät vaikuttavat kudosten morfologiseen ja molekyylliseen rakenteeseen. He toteavat artikkelissaan, että tutkimustulokset pitkäaikaisen säilytysajan vaikutuksesta DNA:n laatuun ovat vaihtelevia. Osassa tutkimuksista kerrotaan, että FFPE-kudoksia voidaan säilyttää vuosia ilman suurempia vaikutuksia myöhempään DNA-analyysiin. Osassa tutkimuksista taas on saatu selville, että säilytysajan kasvaessa DNA:n pilkkoutuminen lisääntyy. Kirjallisuuskatsauksessa todetaan myös, että yli 10 vuotta säilytetyistä FFPE-kudosnäytteistä eristetyt DNA:n käyttöä tulisi välttää DNA-analyysissä, esimerkiksi PCR-monistuksessa, liiallisen pilkkoutumisen vuoksi. Myös Watanabe ym. (2017) selvittivät tutkimuksessaan pitkäaikaisen säilytyksen vaikutusta FFPE-kudoksesta eristetyt DNA:n saantoon, pitoisuuteen ja eheyteen. Tutkimuksessa he käyt-

tivät puolen vuoden, kolmen, kuuden, yhdeksän ja 12 vuoden ikäisiä FFPE-kudosnäytteitä. Tuloksista kävi ilmi, että näytteen iällä ei ollut vaikutusta DNA:n saantoon eikä pitoisuuteen. Sen sijaan DNA:n pilkkoutuminen lisääntyi näytteen iän kasvaessa.

4 DNA

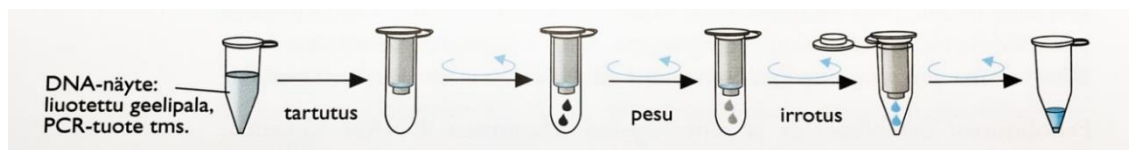
DNA:lla, eli deoksiribonukleiinihapolla, tarkoitetaan perintöainesta, joka sisältää muun muassa geenit eli perintötekijät. Geenit mahdollistavat solujen kehityksen, toiminnan ja informaation siirtämisen jälkeläisille. Ne toimivat ohjeena RNA:n, eli ribonukleiinihapon valmistamiseen, joka taas toimii ohjeena proteiinien valmistamiseen. (Suominen ym. 2013, 13.) Suurin osa ihmisen perimäaineksestä, eli genomista, sijaitsee pakkautuneena tuman kromosomeihin, joita normaalisti on 46 (Nienstedt, Hänninen, Arstila ja Björkqvist 2009, 36, 45). Kromosomit kahdentuvat ennen solun jakautumista, jotta geneettinen informaatio saadaan siirrettyä molemmille tytärsoluille. Kromosomeiksi pakkautuneesta DNA:sta käytetään nimitystä genominen DNA. (Suominen ym. 2013, 11, 105.)

DNA:n rakenneosia ovat nukleotidit, jotka muodostuvat pentoosisokerista sekä siihen kiinnittyneestä fosfaattiryhmästä ja orgaanisesta emäksestä. DNA:ssa pentoosisokerina on deoksiriboosi, ja emäksinä esiintyvät adeniini, guaniini, sytosiini ja tymiini. Nukleotidit kiinnittyvät toisiinsa muodostaen ketjumaisen, pitkän nukleiinihappomolekyylin, jota kutsutaan DNA-juosteeksi. (Suominen ym. 2013, 15–16.) DNA-molekyyli on kaksijuosteinen, ja juosteet kulkevat toisilleen vastakkaisiin suuntiin. Vastakkaisten juosteiden emäkset kiinnittyvät toisiinsa vetysidoksilla ja muodostavat kaksoiskierteen kietoutumalla toistensa ympärille. DNA-juosteiden pituus ilmoitetaan emäspareina, josta käytetään lyhennettä ep tai bp (base pair). (Suominen ym. 2013, 19–21.) Keskimääräinen ihmisen geeni sisältää 27 000 emäsparia, joista kuitenkin vain noin 1300 tarvitaan keskikokoisen proteiinin koodittamiseksi (Solunetti 2006b). DNA-näytteistä voidaan selvittää DNA:n emäsjärjestys sekvensointimenetelmillä, jotka perustuvat näytteessä syntyviin eripituisiin DNA-fragmentteihin. Emäsjärjestyksen selvittämiseen voidaan käyttää esimerkiksi Sangerin sekvensointia, jossa sekvensoitavaa DNA-juostetta käytetään templaattina DNA-synteesiin. Nykyisissä NGS-menetelmissä, eli seuraavan sukupolven massiivisissa paralleelisekvensointitekniikoissa, pystytään suorittamaan samanaikaisesti rinnakkain jopa miljoonien kohde-DNA-jaksojen sekvensointi. (Solunetti 2006a; Suominen ym. 2013, 177, 188.)

4.1 Genomisen DNA:n eristys

DNA:ta eristetään esimerkiksi tutkimuskäyttöä, rikosteknistä tutkintaa ja lääketieteellistä diagnostiikkaa varten. Eristys on mahdollista tehdä erilaisista lähtömateriaaleista, esimerkiksi veren soluista, kudoksista, posken limakalvon epiteelisoluista tai syljessä. (Ghatak, Muthukumaran, ja Nachimuthu 2013; Pursiheimo 2016; Suominen ym. 2013.) Perinteisesti DNA:ta on puhdistettu fenoli- tai fenolikloroformiuutolla, mutta nykyään käytössä on yleisesti kaupallisia DNA:n puhdistukseen tarkoitettuja reagenssisarjoja, eli kittejä, joissa perinteiset menetelmät on korvattu erilaisilla silikamenetelmillä. Spin-kolonnimenetelmässä silika on sidottuna pienessä pylväässä, eli spin-kolonnissa (kuva 1). Kaotrooppi, eli solujen rakennetta hajottava yhdiste, sekä korkea ionivahvuus saavat aikaan sen, että nukleiinihapot sitoutuvat silikamatriksiin. Kaotrooppiliuoksessa oleva DNA-näyte siirretään pylväeseen, joka laitetaan vastaanottoputkeen. Putki sentrifugoidaan, jolloin DNA tarttuu silikalvalvoon, ja loppu liuos siirtyy kalvon läpi. Seuraavaksi spin-kolonnin lisätään etanolia, jolla pestään pois epäpuhtaudet, jonka jälkeen pesuliukset sentrifugoidaan silikan läpi. Viimeiseksi DNA eluoidaan silika-

kalvon läpi pienellä määrällä matalan ionivahvuuden omaavaa puskuria. (Suominen ym. 2013, 105–106.)



KUVA 1. DNA:n eristysvaiheet spin-kolonne-tekniikkaan perustuvalla menetelmällä (mukaillen Suominen ym. 2013, 106.)

Spin-kolonnien lisäksi silikamenetelmä on käytössä myös menetelmissä, jotka perustuvat magneettipartikkeleihin. Magneettipartikkelimenetelmässä DNA sidotaan silikalla päällystettyihin magneettisiin partikkeleihin. Nukleiinihappojen pesussa ja irrotuksessa periaate on sama kuin spin-kolonnimenetelmissä. Magneettipartikkelimenetelmät ovat automatisoitavissa ja sen myötä soveltuvat suurille näytemäärille. (Suominen ym. 2013, 107.)

4.2 DNA:n pitoisuus ja puhtaus

Eristetystä DNA:sta tehtävien tutkimusten on oltava luotettavia ja toistettavissa, joten DNA:n täytyy olla mahdollisimman eheää ja DNA:n määrän täytyy olla riittävän suuri. Tästä syystä genomisen DNA:n laadun, pitoisuuden ja puhtauden arviointi on tärkeä vaihe esimerkiksi ennen sekvensointimenetelmien käyttöä. FFPE-kudosnäytteiden laadunarviointi voi kuitenkin olla haastavaa, sillä eristetyt DNA:n laatu voi vaihdella eri näytteiden välillä ja siihen vaikuttaa myös eristysmenetelmän toimivuus. Jokainen näyte on tutkittava erikseen, jotta voidaan varmistaa eristetyn DNA:n olevan riittävä laadukasta jatkokäsittelyä varten. (McDade Walker 2013.)

Genomisen DNA:n pitoisuuden mittaamiseen on mahdollista käyttää useita eri menetelmiä. Menetelmät perustuvat näytteen absorbanssiin, fluoresenssiin tai agarosigeeli-elektroforeesiin. Yleisimmin käytössä oleva menetelmä on absorbanssin mittaaminen, joka perustuu nukleotidien absorptiomaksimiin aallonpituudella 260 nanometriä (nm). Myös fluorometria ja fluoresoivien DNA:ta sitovien värien käyttö on yleisesti käytössä oleva menetelmä DNA:n määrän mittaamiseen. Fluoresenssiin perustuvat menetelmät ovat tarkempia kuin absorbanssiin perustuvat, varsinkin näytteissä, joissa genomisen DNA:n pitoisuus on pieni. Fluorometri mittaa näytteen pitoisuuden vertaamalla näytteen käyrää standardikäyrään, joka on luotu näytteistä, joissa DNA:n pitoisuus on ollut tiedossa. Agarosigeelillä tehtävällä elektroforeesijolla voidaan myös arvioida DNA:n pitoisuutta, mutta se on menetelmänä epätarkka. (Promega 2017; Suominen ym. 2013, 110–111.)

Absorbanssin mittaamiseen perustuu esimerkiksi mikrovolyymispektrofotometri NanoDropin toiminta. Nanodropissa DNA:n määrän mittaamiseksi riittää 1 µl näytettä ja samalla mittauksella voidaan arvioida myös näytteen puhtautta. Absorptioarvo 1 aallonpituudessa 260 nm vastaa DNA-liuoksen pitoisuutta 50 µg/ml. DNA absorboi jonkin verran vielä aallonpituudessa 280 nm ja näistä kahdesta aallonpituudesta saadaan laskettua puhtaalle DNA-liuokselle absorbanssisuhde, joka on A260

nm/A280 nm = 1,8. Proteiineilla absorptiomaksimi on korkeammalla, noin 280 nm:ssä. Jos absorbanssisuhde on esimerkiksi 1,5, näyte sisältää todennäköisesti proteiineja, jotka ovat merkittävimpiä epäpuhtauksia. Myös fenolijäämät alentavat absorbanssisuhdetta, kun taas näytteissä mahdollisesti olevat RNA ja hiilihydraatit nostavat sitä. (Suominen ym. 2013, 110–111.)

NanoDrop-mittauksesta saadaan myös A260 nm/A230 nm absorbanssisuhde, joka on toissijainen puhtauden arvo. Sillä saadaan selville mahdolliset hiilihydraatti- tai fenolijäämät, jotka absorboivat 230 nm:ssä. 260/230 absorbanssisuhde on yleensä korkeampi kuin 260/280 absorbanssisuhde. Raja-arvot absorbanssisuhteelle 260/230 ovat 2,0–2,2. Arvoa alentavat esimerkiksi fenolijäämät ja arvoa kohottavat esimerkiksi mittauspään epäpuhtaus nollanäytteen mittauksen aikana. (Matlock 2015.)

4.3 DNA:n eheys

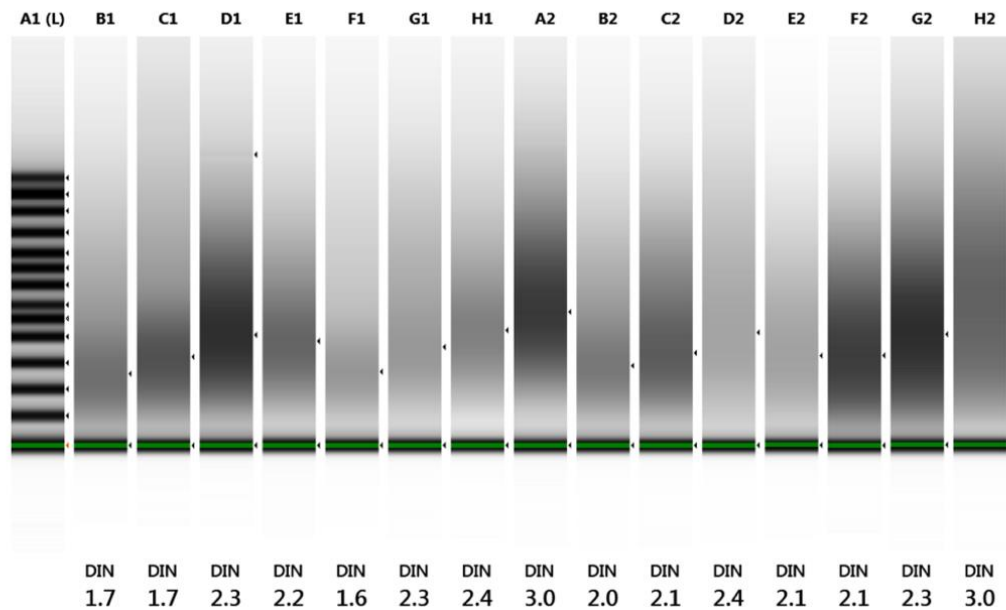
Eheä DNA on pilkkoutumatonta, kooltaan keskimäärin noin 27 000 ep, eli se ei ole pirstaloitunut pienempiin fragmentteihin (Duodecim 2007; Solunetti 2006b). DNA:n eheyden mittaamiseen voidaan käyttää useita eri menetelmiä, jotka perustuvat esimerkiksi elektroforeesiin tai kvantitatiiviseen PCR- eli polymeraasiketjureaktioon. Eristysprosessin aikana DNA katkeaa herkästi, kun DNA-liuosta sekoitetaan voimakkaasti, pipetoidaan ja sentrifugoidaan. Eheyteen voi vaikuttaa myös näytteen muu käsittely sekä säilytys. Tästä syystä DNA:n eheyden mittausta on tärkeää tehdä näytteille esimerkiksi ennen laaja-alaisiin genomisiin analyysiin siirtymistä, sillä analyysissä voidaan käyttää vain tarpeeksi hyvälaatuisia DNA:ta sisältäviä näytteitä. Esimerkiksi genomisten DNA-kirjastojen valmistukseen DNA:n on oltava mahdollisimman eheää sillä sekvensoinnin onnistumisen kannalta oleellista on, kuinka eheää DNA on ja kuinka paljon sitä on saatu eristettyä. Eheyden mittausta käytetään myös lisääntymislääketieteen sekä syöpätutkimusten sovelluksissa. (Jung ym 2017; Suominen ym. 2013, 105; Zonta, Nizard ja Taly 2015.)

FFPE-kudoksesta eristetyn genomisen DNA:n eheyttä voidaan tarkastella esimerkiksi käyttämällä TapeStation-analysointilaitetta. TapeStationissa käytetään Genomic DNA Analysis ScreenTape- menetelmää, jolla mitataan näytteen sisältämän genomisen DNA:n fragmenttien koot. Koon mittausta perustuu geelielektroforeesiin ja ”ladderiin”, joka sisältää standardisoidut, tunnetun kokoiset DNA-fragmentit. ScreenTape-kasetti sisältää geelimatriisin ja puskuriliuoksen, joka on suunniteltu genomisen DNA:n analysointia varten. Kasetti asetetaan TapeStation-laitteeseen, jossa näytteelle tapahtuu elektroforeesi, kuvantaminen ja analysointi. (Agilent Technologies 2017.)

Ajon valmistuttua TapeStation Analysis -ohjelmisto esittää tulokset geelijaokuvana (kuva 2) sekä elektroferogrammina (kuva 3). Kuvista on nähtävissä myös numeerinen arvio DNA:n eheydestä, eli DIN (DNA Integrity Number) -arvo. DIN-arvolla voidaan objektiivisesti ja standardisoidusti arvioida DNA:n eheyttä. Arvon selvittämiseksi TapeStation Analysis-ohjelmisto käyttää algoritmia, joka perustuu noin 7000 eri DNA-näytteen analyysiin. DIN-arvot määritetään asteikolla 1–10, jossa arvo yksi vastaa todella pilkkoutunutta genomista DNA:ta ja arvo 10 erittäin eheää genomista DNA:ta. (Agilent Technologies 2017.) Esimerkiksi Jung, Ji, Song ja Park testasivat tutkimuksessaan, kuinka FFPE-

tuumorinäytteistä eristetyn DNA:n DIN-arvot korreloivat NGS-parametrien kanssa. Tutkimuksessa käytettiin SureSelectXT Reagent kit HSQ (p/n G9611A) -kittiä sekvensointikirjaston valmistukseen, ja kirjaston laatua arviotiin TapeStationin Genomic DNA Analysis Screen Tape- menetelmän tuottamalla DIN-arvolla. Jung ym. toteavat tutkimuksessaan, että näytteissä, joissa DIN-arvo oli alle kolme, DNA ei ollut riittävän laadukasta sekvensointikirjaston valmistukseen heidän käyttämällään kitillä. (Jung ym. 2017.)

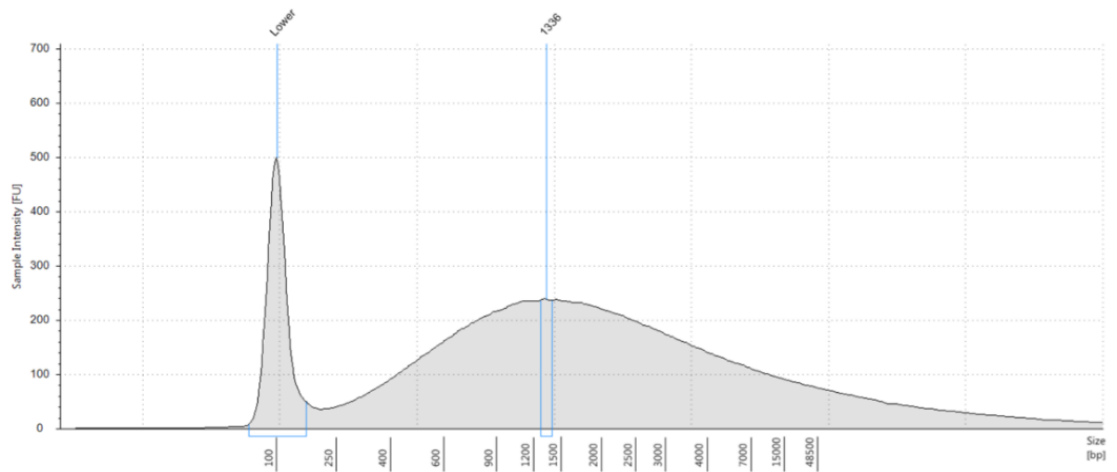
Gel Image



KUVA 2. TapeStation geelijaokuva (Pääkkönen, Ruotsalainen ja Ruuskanen 2017)

TapeStation geelijaokuvassa (kuva 2) on nähtävissä ajon kaikkien näytteiden tulokset. Vasemmassa reunassa, A1 (L) paikalla, on ladder, joka sisältää tietyn kokoiset fragmentit. Erittäin eheää genomista DNA:ta sisältävät näytteet näkyisivät geelijaossa yhtenä selkeänä fragmenttina. Erittäin pilkkoutunut genomisen DNA esiintyy geelijaokuvassa pitkänä pyyhkäisynomaisena jälkenä, mikä on nähtävissä esimerkiksi kuvasta paikalla B1. DIN-arvo esitetään näytteestä tehdyn geelijaon alapuolella. (Agilent Technologies 2017.)

Elektroferogrammissa (kuva 3) on nähtävissä yhden näytteen TapeStation-ajon tulos. Näytteet, jotka sisältävät erittäin eheää genomista DNA:ta näkyvät elektroferogrammissa tarkkarajaisena huippuna ennen ladderin suurinta huippua (48 500 ep). Pilkkoutumisen lisääntyessä elektroferogrammi-käyrässä on nähtävissä pienempiä genomisen DNA:n fragmentteja ja suurin huippu siirtyy kohti pienempiä DNA:n kokoja. Erittäin pilkkoutunut genomisen DNA nähdään elektroferogrammissa leveänä huippuna alle 2000 emäsparin koossa. (Agilent Technologies 2017.)



Sample Table

Well	DIN	Conc. [ng/ul]	Sample Description	Alert	Observations
A2	3.0	64.0			

KUVA 3. TapeStation elektroferogrammi (Pääkkönen, Ruotsalainen ja Ruuskanen 2017-10-26)

Kuvassa 3 on genomisen DNA:n elektroferogrammikäyrä, josta voidaan nähdä näytekohtainen DNA:n eheys geelijokuvaa tarkemmin. Elektroferogrammikäyrän alapuolella on ladderin fragmenttien koot 100–48 500 emäsparia. Näytteen fragmenttien koot vaihtelevat 250 emäsparista yli 48 500 emäspariin. Kuvassa näkyvän käyrän huippu on 1336 emäsparin kohdalla, eli DNA on hyvin pilkkoutunutta. Analysaattori ilmaisee elektroferogrammin yhteydessä myös näytteen konsentraation ja DIN-arvon.

5 TYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Saimme toimeksiannon opinnäytetyöllemme Itä-Suomen Biopankilta. Työ oli kehittämistyö, jonka tavoitteena oli kehittää TMA-laitteella otetuille FFPE-munuaissyöpäkudospaloille toimiva DNA:n eristysmenetelmä. Opinnäytetyössämme oli tarkoitus eristää genomista DNA:ta FFPE-munuaissyöpäkudosnäytteistä ja varmistaa niiden laatu; puhtaus ja pitoisuus mikrovolyymispektrofotometrillä ja eheys geielektroforeesiin perustuvalla analysaattorilla. Laadimme työstä myös työohjeen, joka jää Itä-Suomen Biopankin käyttöön tulevia munuaissyöpäkudoksesta tehtäviä DNA:n eristyksiä varten. Työ toteutettiin Itä-Suomen yliopistolla sijaitsevassa kliinisen patologian ja oikeuslääketieteen oppiaineen sekä Itä-Suomen Biopankin tiloissa Kuopion yliopistollisessa sairaalassa, missä käytössämme oli tarvittavat laboratoriotilat.

5.1 Kehittämistyö

Kehittämistyö on käsitteenä hyvin laaja. Sillä voidaan tarkoittaa esimerkiksi oman työskentelyn kehittämistä yksilötasolla, mutta yhtä hyvin myös laajempaa organisoitua kehittämishanketta. Ominaisista kaikille kehittämistöille on ongelmalähtöinen ja tulosten parantamiseen tähtäävä, tavoitteellinen ja aktiivinen toiminta. Kehittämistöiden tavoitteet voivat olla aineellisia, esimerkiksi työprosessin ja sen tulosten parantaminen, tai aineettomia, kuten työilmapiirin ja työympäristön kehittäminen. Vaikka kehittämistöiden kirjo on laaja, niille kaikille on ominaista käytännönläheinen ja innovatiivinen toiminta. Työn tuloksena syntyvälle tuotokselle on ollut selkeä tarve, ja tuotoksen sisältämä tieto on hyödynnettävissä ja arvioitavissa. (Anttila 2007, 12–14.)

Kehittämistyö alkaa yleensä suunnitteluvaiheella, jossa on tarkoitus tutustua tutkittavaan aiheeseen ja teoreettisen taustaan. Kirjallisuuteen perehtymällä ymmärretään tutkittavaa ilmiötä paremmin, mikä on tärkeää varsinkin silloin, kun aiheen kanssa ei ole aikaisemmin oltu tekemisissä. Suunnitteluvaiheessa täytyy tehdä päätöksiä kehittämiskohteen ongelman rajauksesta ja työkaluista, joilla kehittämistyössä haetaan ongelmaan ratkaisua. (Kananen 2012, 47–48.) Suunnitteluvaiheen jälkeen siirrytään käytännön työn toteutukseen, jonka jälkeen työn tuloksia voidaan arvioida. Tulosten perusteella voidaan joko siirtyä työn viimeistelyvaiheeseen tai jatkaa työstövaihetta. Viimeistelyvaiheessa viimeistellään työn tuloksena syntynyt tuotos ja raportti työstä. Valmis tuotos esitellään ja julkaistaan ja työ päättyy. (Salonen 2013.)

5.2 Hyvä työohje

Työohjeen kirjoittaminen alkaa tavoitteen laatimisella. Tavoite selventää kirjoittajalle, kenelle työohje on suunnattu ja kuinka tarkkaa tietoa sen lukija tarvitsee. Tarvittavan tiedon tarkkuuteen vaikuttaa ohjeen käyttäjän aikaisempi kokemus asiasta. Kun ohjeen tavoite ja kohderyhmä on selvillä, se tarvitsee otsikon, joka kuvaa ohjetta mahdollisimman hyvin. Otsikon jälkeen tulee tarvittaessa johdanto, jossa käydään läpi työssä tarvittavat välineet ja mahdolliset esivalmistelut. Ohjeen tarkoituksena on antaa vastaus siihen, miten ohjeen käyttäjä toimii ja antaa mahdollisesti vastaus myös miksi-kysymykseen. Miksi-kohtaa käytetään, jotta ohjeen käyttäjä osaisi huomioida erityisen tärkeät seikat, kuten varoitukset. (Kankaanpää ja Piehl 2011, 57,296; Torppa 2014, 125–129.)

Ohjeen tarkoituksena on opastaa työn tai asian tekemisessä ja sen on luonnollista edetä työjärjestyksen mukaan, jolloin numerointi on hyvä tapa erottaa kohdat toisistaan. Näin pitkäkin ohje tulee helpommin seurattavaksi. Väliotsikot auttavat myös jäsentämään ohjetta, vaikkei se olisikaan pitkä. Ohjeen toimimisen kannalta on tärkeää käyttää käskymuotoa. Se helpottaa lukijaa ja hän ymmärtää olevansa itse toimija. Myös ohjeen kieleen täytyy kiinnittää huomiota ja valita siinä käytettävät sanat siten, että ne ovat ohjeen lukijalle tuttuja. Oudot termit täytyy avata. Saman sanan toistaminen ohjetekstissä ei haittaa, koska ohjeen tarkoitus on olla ymmärrettävä ja selkeä. (Kankaanpää ja Piehl 2011, 297, 299–300; Torppa 2014, 125–129.)

Laaditun ohjeen ylläpitäminen tulee ajankohtaiseksi esimerkiksi tekniikan kehityksen myötä. Riippuen muutoksen suuruudesta ohje voidaan päivittää tai kirjoittaa uudelleen. Samalla täytyy arvioida ohjeen otsikointi, mahdollinen muuhun aineistoon sopiminen ja linkkien toimivuus, jos materiaali sijaitsee internetissä. (Torppa 2014, 125–129.)

6 TYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyöprosessimme alkoi helmikuussa 2017 Itä-Suomen Biopankin tullessa esittelemään opinnäytetyön aiheita opetusryhmällemme. Itä-Suomen Biopankilla on hallinnassaan Kuopion yliopistollisen sairaalan patologian osastolta siirrettyjä FFPE-kudosnäytteitä (Itä-Suomen Biopankki 2017c) ja heillä oli tarve pystyttää DNA:n eritysmenetelmä FFPE-munuaissyöpäkudosnäytteille vuoden 2017 aikana. Opinnäytetyölle hankittiin tutkimusluvut Pohjois-Savon sairaanhoitopiiriltä. Työn aikataulu suunniteltiin siten, että keväällä 2017 laadittaisiin työsuunnitelma ja eristettäisiin DNA:t, sekä mitattaisiin niiden pitoisuus, puhtaus ja eheys. Suunnitelman mukaan syksyllä 2017 kirjoitettaisiin opinnäytetyön raportti. Suunnitelmasta poiketen emme ehtineet kevään aikana tehdä kaikkia DNA:n eristyksiä, joten jatkoimme DNA:n eristyksiä syksyllä. Eheydet mitattiin, kun kaikki eristykset oli saatu tehtyä. Eheysmittausten jälkeen siirryttiin työhöjeen ja tulostaulukoiden viimeistelyyn sekä raportin kirjoittamiseen.

6.1 Työssä käytetyt näytteet

Patologi valitsi 13–18 vuotta vanhoista FFPE-munuaissyöpäkudosnäytteistä tähän tutkimukseen soveltuvat näytteet ja niistä edustavat kohdat kudospalojen ottoa varten. Tutkija otti jokaisesta näytteestä kaksi halkaisijaltaan 1,5 mm kudospalaa, tuumorin keskeltä ja reunasta. Kudospalat otettiin TMA-laitteella, ja tutkija siirsi ne eppendorf-putkiin, merkitsi niihin juoksevan tunnistenumeron ja tiedon, onko näyte tuumorin reunasta (R) vai keskeltä (K), esimerkiksi 1K ja 1R. Tutkija toimitti näytteet ja listan näyttenumeroista ja niitä vastaavista tunnistenumeroista Itä-Suomen Yliopiston kliinisen patologian ja oikeuslääketieteen oppiaineen laboratorioon, jossa DNA:n eristykset suoritettiin. TMA-laitteella otettiin tätä työtä varten 198 kudospalaa 99 eri FFPE-munuaissyöpäkudosnäytteestä.

Ennen munuaissyöpäkudoksesta tehtävien eristysten aloittamista QIAGENin GeneRead FFPE -kitin (QIAGEN 2014) toimivuus testattiin eristämällä DNA:ta munuaiskudosnäytteistä ($n=25$) ja mittaamalla eristetyn DNA:n pitoisuus ja puhtaus. Kitin työohjetta mukailien laadittiin työohje (liite 1), jonka mukaan munuaissyöpäkudoksen DNA:n eristykset tehtiin.

6.2 DNA:n eristys QIAGEN GeneRead DNA FFPE -kitillä

Työssä käytettiin QIAGENin GeneRead FFPE -kittiä, jolla on mahdollista eristää genomista DNA:ta FFPE-kudoksesta. Kaikki eristyksessä käytetyt reagenssit, etanolia lukuunottamatta, sisältyivät kittiin. Kitin ohjeessa neuvotaan tekemään eristys FFPE-kudoksesta mikrotomilla otetuista, korkeintaan 10 μ m paksuisista leikkeistä. (Qiagen 2014.) Tämän työn tarkoituksena oli eristää DNA:ta alkuperäisestä ohjeesta poiketen TMA-laitteella otetuista, halkaisijaltaan 1,5 mm kudospaloista, joten kitin työohjetta muokattiin työhön paremmin sopivaksi.

Eristämisprosessi (kuva 4) aloitettiin lisäämällä eppendorf-putkiin Deparaffinization Solutionia, jonka tarkoituksena on irrottaa parafiini kudospaloista. Kitin ohjeesta poiketen Deparaffinization Solutionia lisättiin kaksinkertainen määrä. Sen jälkeen näytteitä inkuboitiin 56 celsiusasteessa kolme minuuttia.

Inkuboinnin jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja samalla niitä varten valmistettiin master mix, joka sisälsi RNase-free wateria, Buffer FTB:tä, sekä Proteinase K:ta, jota lisättiin kaksinkertainen määrä kitin ohjeeseen verrattuna. Proteinase K rikkoo ristisidoksia proteiinien ja DNA:n välillä ja näin vapauttaa DNA:ta. Master mix -liuosta lisättiin jokaiseen näyteputkeen, jonka jälkeen näytteet sekoitettiin vortexilla ja sentrifugoitiin. Näytteet siirrettiin 56 celsiusasteeseen lämpökaappiin. (Qiagen 2014.) Kitin ohjeen mukaan Proteinase K -inkubointi kestäisi tunnin ajan. Ohjeesta poiketen näytteitä inkuboitiin lämpökaapissa yön yli, inkubointiajan vaihdelta 14–23 tunnin välillä. Proteinase K -inkuboinnissa käytettiin tasoravistelijalla varustettua lämpökaappia, jonne näyteputkeline asetettiin vinoon sekoittumisen tehostamiseksi.

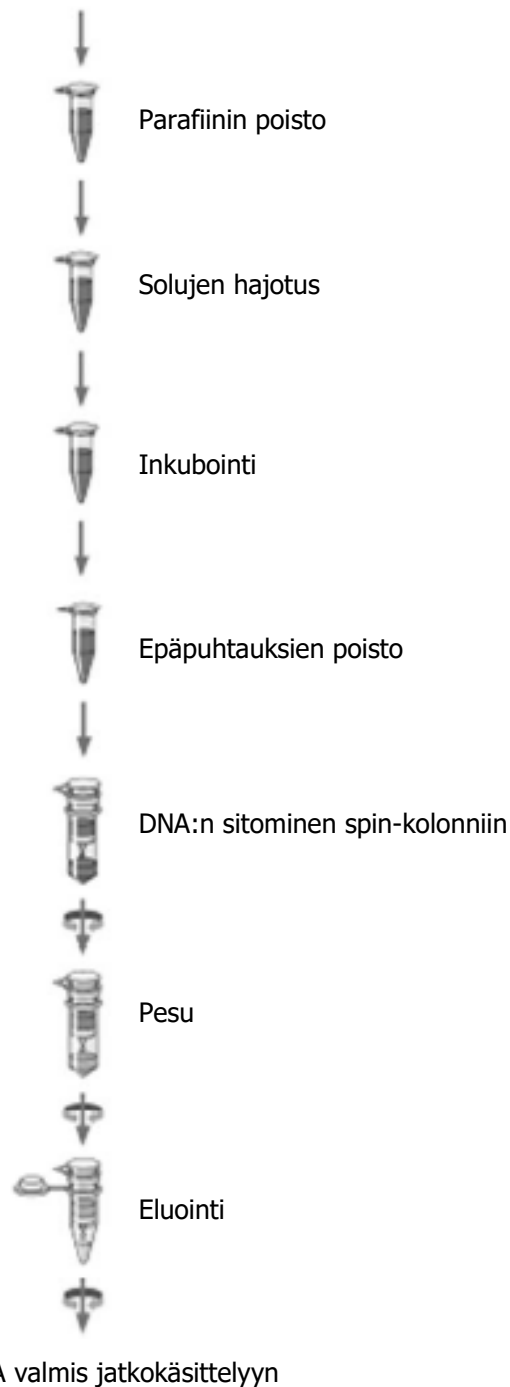
Seuraavana päivänä näytteet siirrettiin inkuboitumaan tunniksi 90 celsiusasteeseen. Inkuboinnin aikana Buffer FTB kumoaa osittain formaliinin aiheuttamia muutoksia nukleiinihapoissa. Inkuboinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin ja alempi, kirkas DNA:ta sisältävä faasi siirrettiin varovasti uuteen eppendorf-putkeen. Näytteisiin lisättiin RNase-free wateria ja suspensoitiin pipetillä. Sen jälkeen näytteisiin lisättiin UNG:a eli urasiili-N-Glykosylaasi-entsyymiä, joka poistaa keinotekoiset urasiilit DNA:sta. Näytteet sekoitettiin vortexilla ja siirrettiin inkuboitumaan 50 celsiusasteeseen tunniksi. (Qiagen 2014.)

Inkuboinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin nopeasti ja niihin lisättiin RNase A:ta, joka on RNA-juosteiden fosfodiesterisidoksia hajottava entsyymi, joka poistaa näytteestä RNA:ta. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä kaksi minuuttia. Näyteputkiin lisättiin soluja hajottavaa Buffer AL:ää ja näytteitä sekoitettiin voimakkaasti vortexilla. Näytteisiin lisättiin etanolia ja sekoitettiin voimakkaasti vortexilla. (Qiagen 2014; Thermo Fisher Scientific 2017.)

Vortexoinnin jälkeen DNA-liuos siirrettiin keräysputkessa olevaan spin-kolonnein, jota sentrifugoitiin täydellä teholla minuutin ajan. Sentrifugoinnin aikana DNA sitoutuu kolonnin kalvolle. Kolonnin läpi tullut neste hävitettiin ja vaihe toistettiin niin monta kertaa, että kaikki DNA-liuos oli ajettu kolonnin läpi. Kolonnin kalvolle jääneet epäpuhtaudet pestiin pois ensin AW1-puskurilla, sitten AW2-puskurilla ja lopuksi etanolilla. Etanolilla pesemisen jälkeen sentrifugointi toistettiin kaksi kertaa, jotta kaikki etanoli saatiin poistettua kolonnista.

Puhdasta DNA:ta varten valmisteltiin eppendorf-putket, joita tuli jokaista näytettä kohden kolme, yksi kullekin eluutiokerralle. Spin-kolonnein asetettiin eppendorf-putkeen ja pipetoitiin kolonnin kalvon keskelle 40 µl Buffer ATE:a, joka irroittaa DNA:n kalvolta. Näytteitä inkuboitiin viisi minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin. Kitin ohjeen mukaan eluointi tehtäisiin vain yhden kerran. Ohjeesta poiketen eluointi toistettiin kolme kertaa, jotta voitiin varmistua kaiken DNA:n irronneen kolonnin kalvolta. Eristysten jälkeen siirryttiin pitoisuuksien ja puhtauksien mittaamiseen.

DNA:n eristys QIAGEN GeneRead DNA FFPE-kitillä

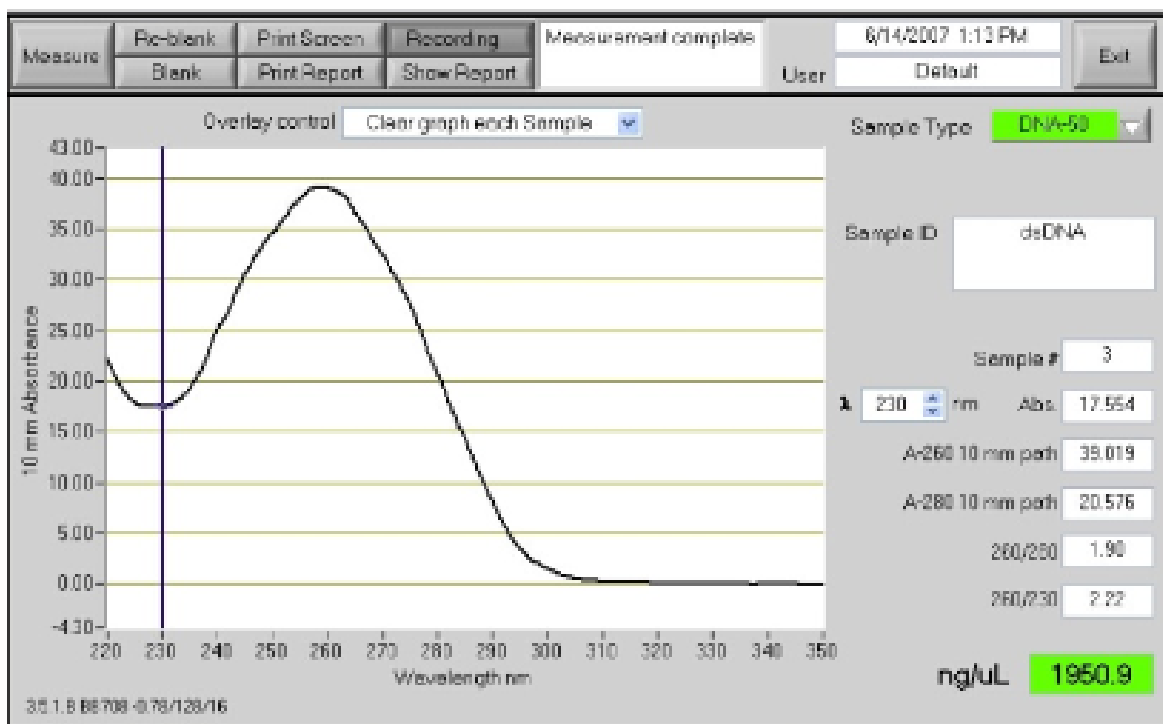


KUVA 4. QIAGEN GeneRead DNA FFPE-kitin toimintaperiaate (mukaillen Qiagen 2014)

6.3 DNA:n pitoisuuden ja puhtauden mittaus

Eristetyn DNA:n pitoisuuden ja puhtauden mittaamiseen käytettiin Thermo Fisher Scientificin mikrovolyymispektrofotometri NanoDropia. Mittaukset suoritettiin heti eluointien jälkeen. NanoDrop esivalmisteltiin pipetoimalla 1 μ l tislattua vettä mittauspäähän puhdistamiseksi ja 1 μ l Buffer ATE:a nollanäytteeksi, jonka tarkoituksena oli poistaa mittaustuloksista eluutiopuskurin aiheuttama absorbaanssihäiriö. Mittauspääät puhdistettiin jokaisen näytteen välissä sellulla pyyhkimällä.

Esivalmisteluiden jälkeen aloitettiin näytteiden mittaukset, jotka suoritettiin 1 µl:lla näytettä. NanoDrop antoi tulokset pitoisuutena ng/µl ja puhtauksien osalta absorbanssisuhteet 260/280 ja 260/230. Mittaustuloksesta piirtyi myös absorbanssikäyrä, josta esimerkki kuvassa 5. Pitoisuus- ja puhtaustulokset siirrettiin Exceliin laadittuun yhteenvetotaulukkoon.



KUVA 5. NanoDrop-mittaustulos (mukailien Thermo Fisher Scientific 2010, 5-1.)

6.4 DNA:n eheyden mittaus

Eheyden mittaukset tehtiin Itä-Suomen Biopankin laboratoriossa Kuopion Yliopistollisessa sairaalassa, sen jälkeen kun kaikki eristykset oli tehty. Mittaukset tehtiin ainoastaan ensimmäisen eluution näytteille, koska NanoDrop-mittausten perusteella voitiin todeta lähes kaiken DNA:n irronneen spin-kolonniin kalvolta ensimmäisessä eluutiosta. DNA-näytteiden eheyden mittaamiseen käytettiin Agilent 4200 TapeStation-analysaattoria, jossa käytetään Genomic DNA Analysis ScreenTape -menetelmää. Mittaus tuotti DIN-arvon, jonka avulla pystyimme tarkastelemaan DNA:n eheyttä. Menetelmän toimivuuden kannalta näytteen konsentraation tulisi olla 10–100 ng/µl, joten mittauksia varten laimensimme näytteet, joiden pitoisuus oli suurempi.

Laimennokset tehtiin 96-kuoppalevyille steriiliin veteen. Näytteitä laimennettiin näytteen konsentraation perusteella 1:9, 1:4 tai 1:1. Kuoppalevyttä pipetoitiin 1 µl näytettä eppendorf-liuskan näyteputkiin 2–16, joihin oli pipetoitu 10 µl Genomic DNA Sample Bufferia. Liuskan ensimmäiseen putkeen pipetoitiin 1 µl Genomic DNA Ladderia eli standardinäytettä. Näytteitä sekoitettiin tasoravistelijalla minuutin ajan ja sen jälkeen ne sentrifugoitiin lyhyesti. Liuskat asetettiin TapeStation-laitteeseen, johon oli ennalta syötetty näytteiden tunnistenumerot. Eheys pystyttiin mittaamaan 195 näytteestä, koska kolmen näyteputken näyte oli kuivunut säilytyksen aikana.

6.5 Tulosten dokumentointi

Tulosten dokumentointia varten laadittiin Excel-taulukko (kuva 6), johon tehtiin sarakkeet näytteiden taustatiedoille, eli blokki- ja tunnistenumeroille (ID), näytteen iälle, puntsin eli kudoksen halkaisijalle ja näytteen ottokohdalle tuumorista. DNA:n eristykseen liittyville tiedoille tehtiin omat sarakkeet, joihin kirjattiin eristyspäivämäärä, eluutiotilavuus, eluutiokerta ja Proteinase K -inkuboinnin kesto. Taulukkoon tehtiin sarakkeet DNA:n määrälle (ng/μl ja ng/näyte), puhtausarvoille (260/280 ja 260/230) ja DIN-arvolle. DNA:n määrä ng, eli saanto, saatiin kertomalla DNA:n määrä ng/μl eluutiotilavuudella, joka oli kaikissa näytteissä 40 μl. Tiedot dokumentoitiin taulukkoon heti jokaisen eristyskerran päätteeksi DIN-arvoja lukuun ottamatta, jotka dokumentoitiin eheys -mittausten jälkeen.

Blokkinumero	ID	Ikä	Pvm	Puntsien halkaisija mm	Tuumorin kohta keskeltä, reunasta	Eluutiotilavuus μl	Eluutiokerta	DNA:n määrä ng/ul	260/280	260/230	DNA:n määrä ng	DIN	Inkubointiaika prot-k h
	1K/1	18	28.4.2017	1,5	K	40	1	60,998	1,768	1,447	2440	1,7	14
	1K/2	18	28.4.2017	1,5	K	40	2	12,291	1,683	0,99	492		14
	1K/3	18	28.4.2017	1,5	K	40	3	9,826	1,459	0,862	393		14
	1R/1	18	28.4.2017	1,5	R	40	1	116,474	1,8	2,036	4659	1,7	14
	1R/2	18	28.4.2017	1,5	R	40	2	26,394	1,693	1,256	1056		14
	1R/3	18	28.4.2017	1,5	R	40	3	26,572	1,554	0,859	1063		14
	2K/1	17	28.4.2017	1,5	K	40	1	245,507	1,777	1,773	9820	2,3	14
	2K/2	17	28.4.2017	1,5	K	40	2	37,313	1,761	1,838	1493		14
	2K/3	17	28.4.2017	1,5	K	40	3	22,808	1,686	0,919	912		14
	2R/1	17	28.4.2017	1,5	R	40	1	159,975	1,8	1,802	6399	2,2	14
	2R/2	17	28.4.2017	1,5	R	40	2	38,53	1,624	0,921	1541		14
	2R/3	17	28.4.2017	1,5	R	40	3	67,077	1,553	0,611	2683		14
	3K/1	17	28.4.2017	1,5	K	40	1	66,066	1,771	1,492	2643	1,6	14
	3K/2	17	28.4.2017	1,5	K	40	2	23,505	1,637	0,821	940		14
	3K/3	17	28.4.2017	1,5	K	40	3	10,456	1,701	0,765	418		14
	3R/1	17	28.4.2017	1,5	R	40	1	120,326	1,743	1,326	4813	2,3	14
	3R/2	17	28.4.2017	1,5	R	40	2	47,799	1,589	0,763	1912		14
	3R/3	17	28.4.2017	1,5	R	40	3	18,73	1,665	1,04	749		14

KUVA 6. Tulostaulukko (Pääkkönen, Ruotsalainen ja Ruuskanen 2017-10-26)

Kuvassa on esimerkkinä kolmen eri munuaisyöpäkudoksen näytteen tulokset. Jokaisesta näyteblokkista on otettu kudospalat tuumorin keskeltä ja reunasta, joten samalla blokkinumeroilla on kaksi näytettä eri ID-tunnisteella eli tunnistenumerolla, esimerkiksi 1K ja 1R. Jokaisen näytteen tunnistenumeron viimeinen numero kertoo eluutiokerran. Esimerkiksi 3K/1 tarkoittaa näytettä, jonka tunnistenumero on kolme, sen ensimmäistä eluutiota tuumorin keskeltä otetusta näytteestä. Kaikkien näytteiden ($n=198$) jokaisen kolmen eluution mittaustulokset ($n=594$) koostettiin taulukkoon kuvassa esitetyllä tavalla. Taulukko mahdollistaa monipuolisen tietojen tarkastelun, esimerkiksi suodattamalla tulokset eluutiokerran, eristyspäivän tai pitoisuuden mukaan.

7 TYÖN TULOKSET

7.1 Eristetyn DNA:n pitoisuus ja saanto

Koostimme kaikkien munuaissyöpäkudoksenäytteiden ($n=198$) kolmen eluution pitoisuuden ja saannon mittaustulokset ($n=594$) taulukoihin. Tulokset on jaettu eluutiokertojen ja näytteenottokohdan, tuumorin keskeltä (taulukko 1) ja reunasta (taulukko 2) mukaan. Pitoisuus ja saanto esitetään keskiarvoina, jonka lisäksi taulukoissa on kunkin eluution pitoisuuden ja saannon vaihteluvälit. Jokainen eluutio tehtiin 40 μ l ATE-puskuria.

TAULUKKO 1. Tuumorin keskeltä otetuista näytteistä ($n=99$) eristetyn DNA:n pitoisuus ja saanto

eluutio	ka. pitoisuus ng/ μ l	vaihteluväli ng/ μ l	ka. saanto μ g	vaihteluväli μ g
1	244,76	7,43 – 734,92	9,79	0,30 – 29,40
2	49,40	2,65 – 134,85	1,98	0,17 – 5,39
3	25,96	2,66 – 88,27	1,04	0,17 – 3,53

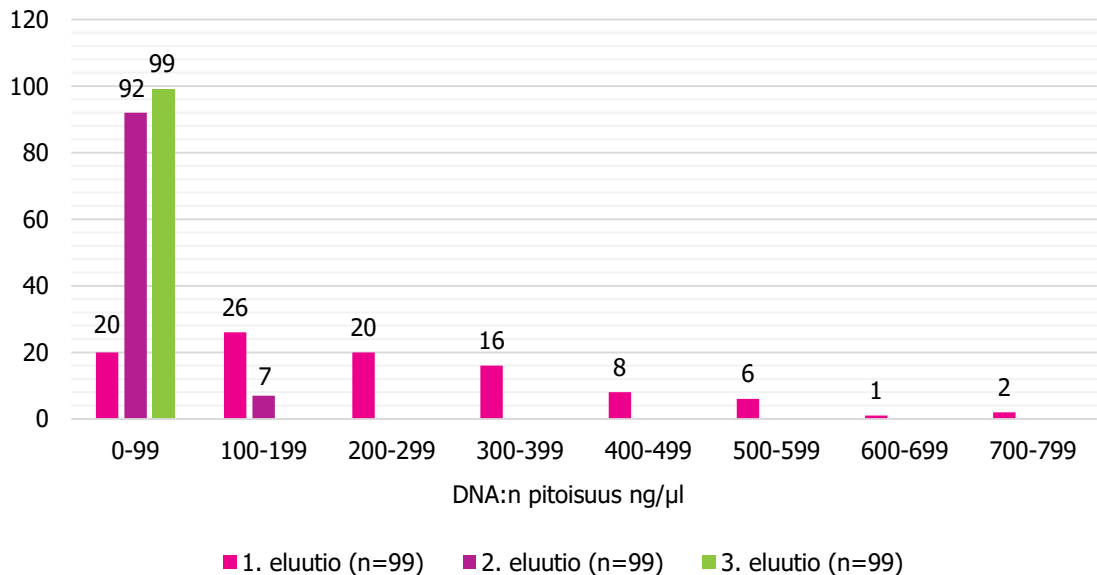
Tuumorin keskeltä otettujen näytteiden ensimmäisen eluution pitoisuuden vaihteluväli oli 7,43–734,92 ng/ μ l, keskiarvon ollessa 244,76 ng/ μ l. Saannon vaihteluväli oli 0,30–29,40 μ g ja keskiarvo oli 9,79 μ g. Toisessa ja kolmannessa eluutiassa pitoisuudet ja saannot laskivat odotetusti.

TAULUKKO 2. Tuumorin reunasta otetuista näytteistä ($n=99$) eristetyn DNA:n pitoisuus ja saanto

eluutio	ka. pitoisuus ng/ μ l	vaihteluväli ng/ μ l	ka. saanto μ g	vaihteluväli μ g
1	266,46	17,94 – 653,05	10,66	0,72 – 26,12
2	56,51	5,30 – 169,65	2,26	0,21 – 6,79
3	32,65	3,54 – 412,885	1,31	0,14 – 16,52

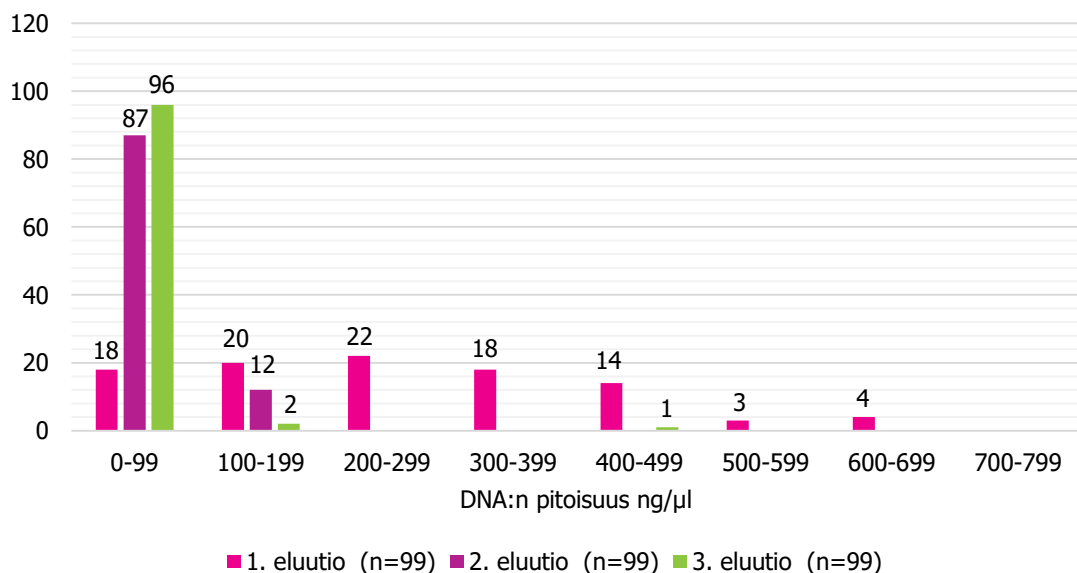
Tuumorin reunasta otettujen näytteiden pitoisuudet ja saannot olivat hieman korkeampia kuin tuumorin keskeltä otettujen. Tuumorin reunasta otettujen näytteiden ensimmäisen eluution pitoisuuden vaihteluväli oli 17,94–653,05 ng/ μ l ja keskiarvo 266,46 ng/ μ l. Saanto vaihteli tuumorin reunasta otetuissa näytteissä 0,72–26,12 μ g välillä keskiarvon ollessa 10,66 μ g. Myös reunasta otettujen näytteiden toisen ja kolmannen eluution pitoisuudet ja saannot olivat odotetusti pienempiä.

Laadimme eristetyn DNA:n pitoisuuksien mittaustuloksista myös pylväskaaviot (kuviot 2 ja 3). Kaavioissa mittaustulokset jaettiin luokkiin 100 ng/ μ l välein. Tuumorin keskeltä ja reunasta otettujen näytteiden tulokset ovat omissa kaavioissaan, joihin on koostettu kaikkien kolmen eluution mittaustulokset. Kaavion vaaka-akselille on sijoitettu näytteiden DNA-pitoisuudet ng/ μ l ja pystyakselille näytteiden lukumäärä.



KUVIO 2. Tuumorin keskeltä otetuista kudoksenäytteistä ($n=99$) eristetyn DNA:n pitoisuuksien jakauma ensimmäisessä, toisessa ja kolmannessa eluutiossa

Tuumorin keskeltä otettujen näytteiden ensimmäisen eluution DNA-pitoisuudet olivat suurimmassa osassa näytteistä ($n=79$) yli 100 ng/μl, kun taas toisessa eluutiossa lähes kaikkien näytteiden ($n=92$) pitoisuudet jäivät alle 100 ng/μl. Kolmannessa eluutiossa kaikkien näytteiden ($n=99$) pitoisuudet olivat alle 100 ng/μl.



KUVIO 3. Tuumorin reunasta otetuista kudoksenäytteistä ($n=99$) eristetyn DNA:n pitoisuuksien jakauma ensimmäisessä, toisessa ja kolmannessa eluutiossa

Tuumorin reunasta otettujen näytteiden ensimmäisen eluution DNA-pitoisuudet olivat suurimmassa osassa näytteistä ($n=81$) yli 100 ng/μl, kun taas toisessa eluutiossa lähes kaikkien näytteiden ($n=87$) pitoisuudet jäivät alle 100 ng/μl. Myös kolmannessa eluutiossa lähes kaikkien näytteiden ($n=96$) pitoisuudet olivat alle 100 ng/μl.

7.1.1 Pitoisuus ja saanto Proteinase K -inkubointiajan mukaan

Eristyksien Proteinase K -inkubointiajat vaihtelivat 14 tunnista 23 tuntiin. Laadimme ensimmäisen eluution mittaustuloksista erilliset taulukot tuumorin keskeltä (taulukko 3) ja tuumorin reunasta (taulukko 4) otetuille näytteille, joissa on esitetty pitoisuuksien ja saantojen keskiarvot ja vaihteluvälit inkubointiaikojen mukaan jaoteltuna.

TAULUKKO 3. Tuumorin keskeltä eristettyjen DNA-näytteiden pitoisuus ja saanto Proteinase K -inkubointiaikojen mukaan

Proteinase K - inkubointiaika	<i>n</i>	ka. pitoisuus ng/μl	pitoisuuden vaihteluväli ng/μl	ka. saanto μg	saannon vaihte- luväli μg
14	18	227	49,58 – 734,92	9	1,98 – 29,40
18	18	278	66,37 – 613,50	11	2,66 – 24,54
19	18	303	64,20 – 705,54	12	2,57 – 28,22
22	9	242	57,63 – 417,52	10	2,31 – 16,70
23	36	208	7,43 – 565,16	8	0,30 – 22,60
	99				

23 tunnin Proteinase K -inkubointiaika oli yleisin ($n=36$). Pitoisuuden ja saannon vaihteluvälit olivat jokaisella inkubointiajalla suuria, esimerkiksi 23 tunnin inkuboinnissa pitoisuus oli 7,43–565,16 ng/μl ja saanto 0,30–22,60 μg. Korkein pitoisuuden ja saannon keskiarvo oli 19 tunnin Proteinase K -inkuboinnilla.

TAULUKKO 4. Tuumorin reunasta eristettyjen DNA-näytteiden pitoisuus ja saanto Proteinase K -inkubointiaikojen mukaan

Proteinase K - inkubointiaika	<i>n</i>	ka. pitoisuus ng/μl	pitoisuuden vaihteluväli ng/μl	ka. saanto μg	saannon vaihte- luväli μg
14	18	272	56,88 – 653,05	11	2,28 – 26,12
18	18	287	80,85 – 601,85	11	3,23 – 24,07
19	17	310	58,80 – 649,28	12	2,35 – 25,97
22	9	235	47,50 – 468,50	9	1,90 – 18,74
23	37	241	17,94 – 651,11	10	0,72 – 26,04
	99				

Tuumorin reunasta ja keskeltä otettujen näytteiden DNA eristettiin samaan aikaan, joten 23 tunnin Proteinase K -inkubointiaika oli yleisin ($n=37$) myös reunasta otetuille näytteille. Pitoisuuden ja saannon vaihteluvälit olivat jokaisella inkubointiajalla suuria, esimerkiksi 14 tunnin inkuboinnissa pitoisuus oli 56,88–653,05 ng/μl ja saanto 2,28–26,12 μg. Korkein pitoisuuden ja saannon keskiarvo oli myös tuumorin reunasta otetuissa näytteissä 19 tunnin Proteinase K -inkuboinnilla.

7.1.2 Pitoisuus ja saanto näytteenottokohdan ja näytteen iän mukaan

Munuaissyöpäkudoksenäytteitä oli 198, joista 99 oli tuumorin keskeltä ja 99 tuumorin reunasta. Näytteet olivat 13–18 vuotta vanhoja ja niiden määrät ($n=18–21$) ikäluokkien välillä eivät vaihdelleet

merkittävästi, lukuunottamatta 18-vuotiaita näytteitä, joita oli vain yksi. Ensimmäisen eluution mitaustuloksista laadittiin erilliset taulukot (taulukko 5 ja taulukko 6) näytteenottokohdan mukaan. Taulukoissa esitetään tietyn ikäisistä munuaissyöpäkudoksenäytteistä eristetyn DNA:n pitoisuuksien ja saantojen keskiarvot ja vaihteluvälit.

TAULUKKO 5. Tuumorin keskeltä otettujen näytteiden DNA:n pitoisuuksien ja saantojen keskiarvot iän mukaan

näytteen ikä	<i>n</i>	ka. pitoisuus ng/μl	pitoisuuden vaihteluväli ng/μl	ka. saanto μg	saannon vaihte- luväli μg
13	18	193	18,53 – 565,16	7,71	0,74 – 22,61
14	21	236	7,43 – 542,30	9,42	0,30 – 21,70
15	19	338	64,20 – 705,54	13,52	2,57 – 28,20
16	19	222	49,58 – 594,13	8,89	1,98 – 23,77
17	21	244	57,63 – 734,92	9,74	2,31 – 29,40
18	1	61	–	2,44	–
	99				

Tuumorin keskeltä otettujen näytteiden DNA -pitoisuuksien ja -saantojen keskiarvot olivat parhaimmat 15 vuoden ikäisillä näytteillä. Pitoisuuksien vaihteluväli oli 64,20–705,54 ng/μl ja saannon vaihteluväli 2,57–28,20 μg. Myös muun ikäisillä näytteillä pitoisuuden ja saannon vaihteluvälit olivat suuria.

TAULUKKO 6. Tuumorin reunasta otettujen näytteiden DNA:n pitoisuuksien ja saantojen keskiarvot iän mukaan

näytteen ikä	<i>n</i>	ka. pitoisuus ng/μl	pitoisuuden vaihteluväli ng/μl	ka. saanto μg	saannon vaihte- luväli μg
13	18	195	19,26 – 440,81	7,81	0,77 – 17,63
14	21	280	17,94 – 506,67	11,20	0,72 – 20,27
15	19	367	64,59 – 651,11	14,66	2,58 – 26,04
16	19	221	56,88 – 489,57	8,83	2,28 – 19,58
17	21	272	47,50 – 653,05	10,88	1,90 – 26,12
18	1	116	–	4,66	–
	99				

Myös tuumorin reunasta otettujen näytteiden DNA -pitoisuuksien ja -saantojen keskiarvot olivat parhaimmat 15 vuoden ikäisillä näytteillä. Pitoisuuksien vaihteluväli oli 64,59–651,11 ng/μl ja saannon vaihteluväli 2,58–26,04 μg. Myös muun ikäisillä näytteillä pitoisuuden ja saannon vaihteluvälit olivat suuria. Taulukoista voidaan havaita, että tuumorin keskeltä ja reunasta otetuissa näytteissä tulokset olivat lähes rinnakkaisia saman ikäisillä näytteillä. Osassa tuumorin reunasta otetuissa näytteissä oli hieman korkeammat DNA:n pitoisuudet kuin tuumorin keskeltä otetuissa, mutta erot eivät olleet suuria.

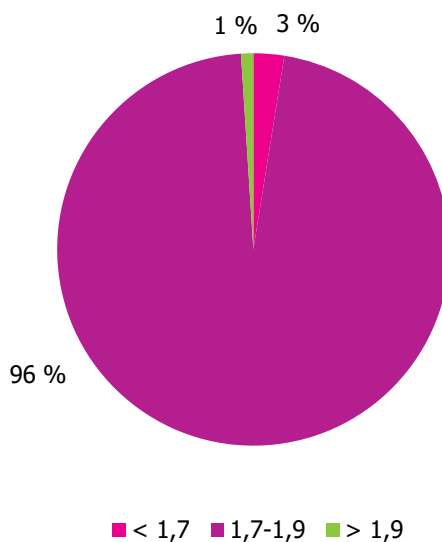
7.2 Eristetyn DNA:n puhtaus

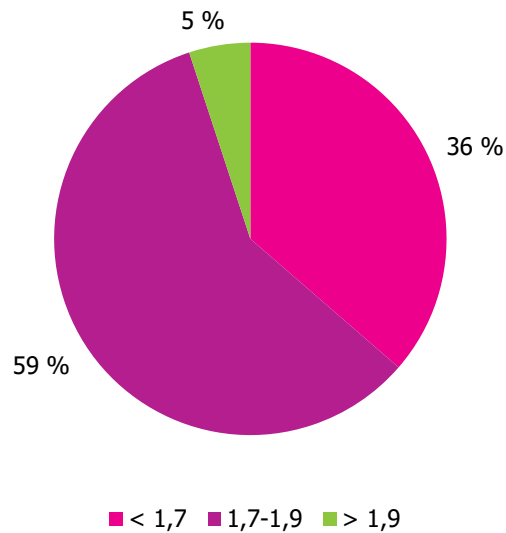
Munusaissyöpäkudoksesta eristettyjen DNA-näytteiden ($n=198$) puhtausarvot saatiin samalla Nano-Drop -mittauksella pitoisuuksien kanssa. Mittaukset tehtiin kaikista kolmesta eluutiosta ja mittaustuloksista ($n=594$) koostettiin taulukko (taulukko 7). Mittauksissa saaduista kahdesta puhtausarvosta käsitellään vain ensisijaista, eli A260/A280 absorbanssisuhdetta, jonka raja-arvo puhtaalle DNA:lle on 1,7–1,9. Saadut mittaustulokset jaettiin kolmeen luokkaan: alle 1,7, 1,7–1,9 ja yli 1,9. Mittaustulosten jakautuminen luokkiin on kuvattu taulukossa lukumäärinä ja prosenttiosuuksina.

TAULUKKO 7. Eristetyn DNA:n puhtaus

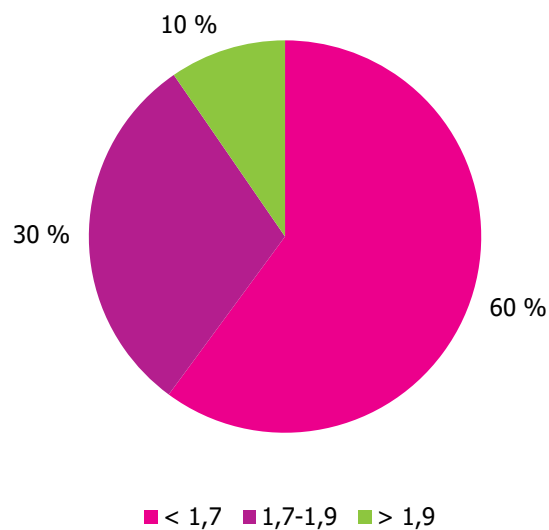
Puhtaus	1. eluutio		2. eluutio		3. eluutio	
	n	%-osuus	n	%-osuus	n	%-osuus
< 1,7	5	3	72	36	119	60
1,7-1,9	191	96	116	59	60	30
> 1,9	2	1	10	5	19	10
	198		198		198	

Ensimmäisessä eluutiosta lähes kaikki eristetyt DNA-näytteet ($n=191$) olivat puhtauden raja-arvojen, 1,7–1,9, sisällä. Ainoastaan 4 prosenttia näytteistä oli epäpuhtaita. Toisen eluution näytteistä raja-arvojen sisällä oli enää 59 prosenttia ($n=116$) näytteistä ja kolmannessa eluutiosta puhtaiden näytteiden osuus laski 30 prosenttiin ($n=60$). Tulokset esitetään myös ympyräkaaviossa (kuvio 4, kuvio 5 ja kuvio 6).

KUVIO 4. Näytteiden puhtauden jakauma 1. eluutiosta ($n=198$)



KUVIO 5. Näytteiden puhtauden jakauma 2. eluutiosta ($n=198$)



KUVIO 6. Näytteiden puhtauden jakauma 3. eluutiosta ($n=198$)

7.3 Eristetyn DNA:n eheys

Eristettyjen DNA-näytteiden ($n=198$) eheys mitattiin TapeStationilla, joka antaa näytteiden DNA:n eheyttä kuvaavan DIN-arvon. Mittaukset suoritettiin ainoastaan ensimmäisen eluution näytteille, joista 195 näytteelle saatiin tulos. DIN-arvot olivat välillä 1,4–5,1. DIN-arvojen jakauma kuvataan taulukossa (taulukko 8) lukumäärinä ja prosenttiosuuksina jaoteltuna näytteenottokohdan, tuumorin keskeltä ja reunasta, mukaan.

TAULUKKO 8. DIN-arvojen jakauma lukumäärinä ja prosenttiosuuksina näytteenottokohdan mukaan

DIN	tuumorin keskeltä		tuumorin reunasta	
	(<i>n</i>)	%-osuus	(<i>n</i>)	%-osuus
1-1,9	18	19	14	14
2-2,9	49	51	55	56
3-3,9	27	28	27	28
4-5,5	3	3	2	2
	97	100	98	100

Tuumorin keskeltä otetuista näytteistä 31 prosentilla ($n=30$) näytteistä DIN-arvo oli yli kolme. 51 prosentilla ($n=49$) näytteistä DIN-arvo oli 2–2,9 ja 19 prosentilla ($n=18$) DIN-arvo oli alle kaksi. Tuumorin reunasta otetuista näytteistä 30 prosentilla ($n=29$) DIN-arvo oli yli kolme. 56 prosentilla ($n=55$) näytteistä DIN-arvo oli 2–2,9 ja 14 prosentilla ($n=14$) DIN-arvo oli alle kaksi. Taulukosta voidaan havaita tuumorin reunasta otetuilla näytteillä olevan vähemmän heikoimpia DIN-arvoja (1–1,9) kuin tuumorin keskeltä otetuissa näytteissä.

7.3.1 DNA:n eheys Proteinase K -inkubointiajan mukaan

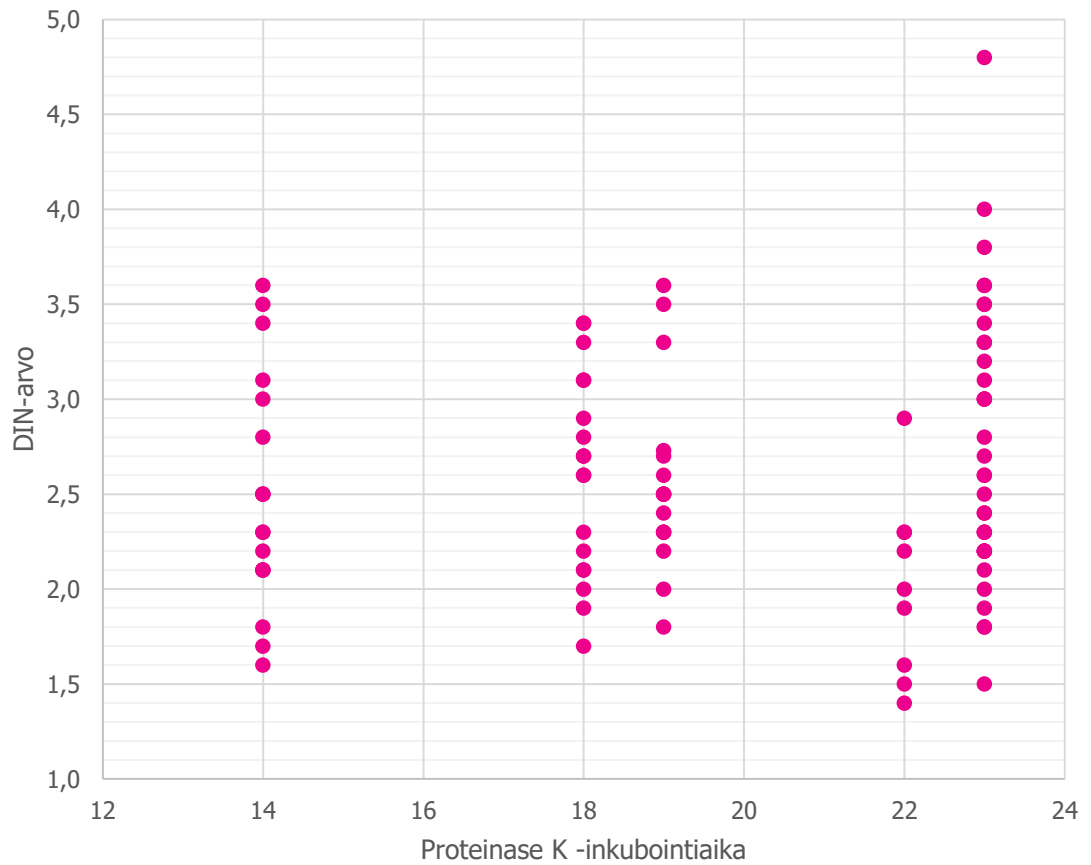
Eristyksien Proteinase K -inkubointiajat vaihtelivat 14 tunnista 23 tuntiin. Laadimme DIN-arvon, eli eheyden mittaustuloksista taulukon (taulukko 9) ja pistekaaviot (kuviot 7 ja 8). Taulukossa esitetään DIN-arvojen keskiarvot ja vaihteluvälit inkubointiaikojen ja näytteenottokohdan, tuumorin keskeltä ja reunasta, mukaan jaoteltuna.

TAULUKKO 9. DIN-arvojen keskiarvot ja vaihteluvälit Proteinase k -inkubointiaikojen ja näytteenotokohdan mukaan

Proteinase K - inkubointiaika	ka. DIN-arvo tuumorin keskeltä			ka. DIN-arvo tuumorin reunasta		
	<i>n</i> keskeltä	keskeltä	vaihteluväli	<i>n</i> reunasta	reunasta	vaihteluväli
14	17	2,3	1,6 – 3,0	18	2,5	1,6 – 3,6
18	18	2,5	1,7 – 4,2	18	2,6	1,7 – 3,4
19	17	2,7	1,7 – 3,9	17	2,6	1,8 – 3,6
22	9	2,1	1,6 – 3,6	9	2,0	1,4 – 2,9
23	36	2,8	1,5 – 5,1	36	2,8	1,5 – 4,8
	97			98		

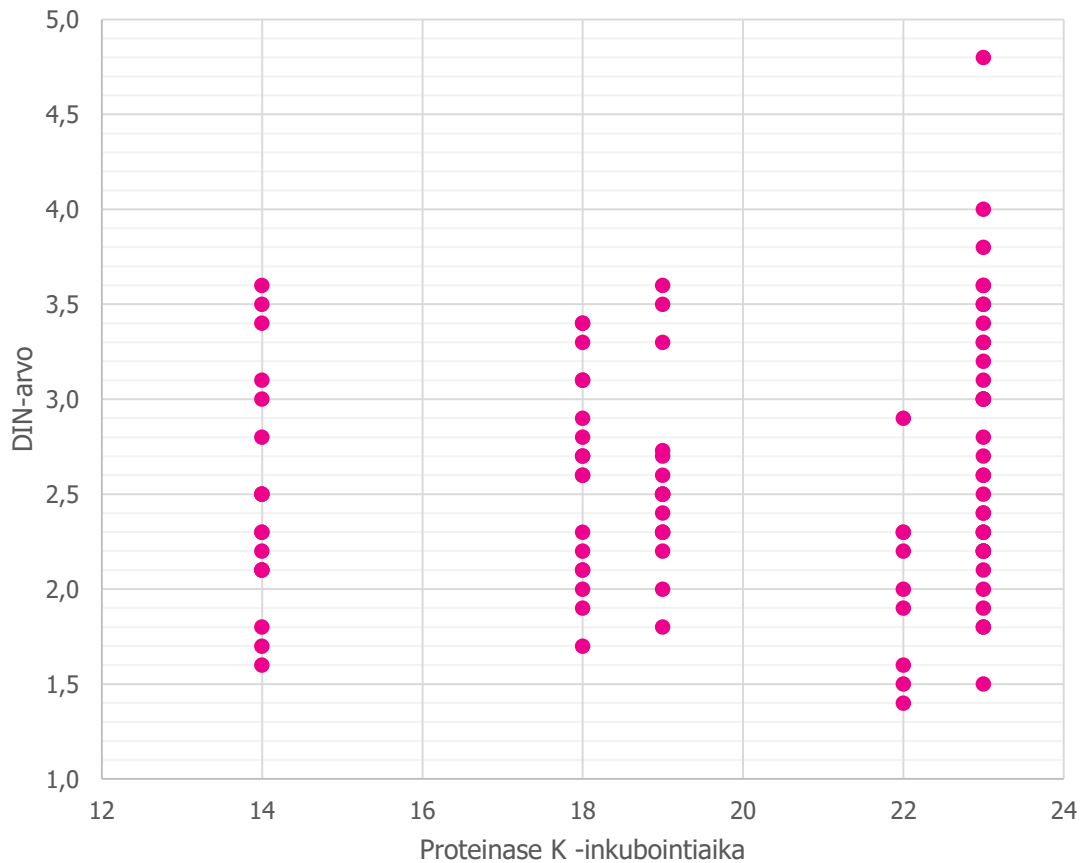
Tuumorin keskeltä ja reunasta otetuista näytteistä paras DIN-arvojen keskiarvo (2,8) oli näytteillä, joiden Proteinase K -inkubointiaika oli 23 tuntia. Tuumorin keskeltä otettujen näytteiden DIN-arvojen vaihteluväli oli 1,5–5,1 ja tuumorin reunasta otettujen näytteiden 1,5–4,8. Taulukosta voidaan havaita DIN-arvojen olevan melko yhteneväisiä näytteenottokohdasta riippumatta, kun inkubointiaika oli sama.

Tuumorin keskeltä ja reunasta otetuille näytteille laadittiin erilliset pistekaaviot (kuviot 7 ja 8). Kaa-
vioiden vaaka-akselilla on Proteinase K -inkubointiaika ja pystyakselilla DIN-arvo. DIN-arvot saatiin 195 näytteelle, joista 97 oli tuumorin keskeltä ja 98 tuumorin reunasta.



KUVIO 7. Tuumorin keskeltä otettujen munuaissyöpäkudoksenäytteiden ($n=97$) DIN-arvot Proteinase K -inkubointiajan mukaan

Kuviosta 7 voidaan nähdä, että Proteinase K -inkubointiajan pituudella ei ollut suoraa yhteyttä tuumorin keskeltä otettujen näytteiden DIN-arvoihin. Parhaat DIN-arvot saatiin 23 tunnin Proteinase K -inkuboinnilla kun taas heikoimmat 22 tunnin inkuboinnilla. 14, 18 ja 19 tunnin Proteinase K -inkubointiaikojen välillä DIN-arvot jakautuivat melko tasaisesti.

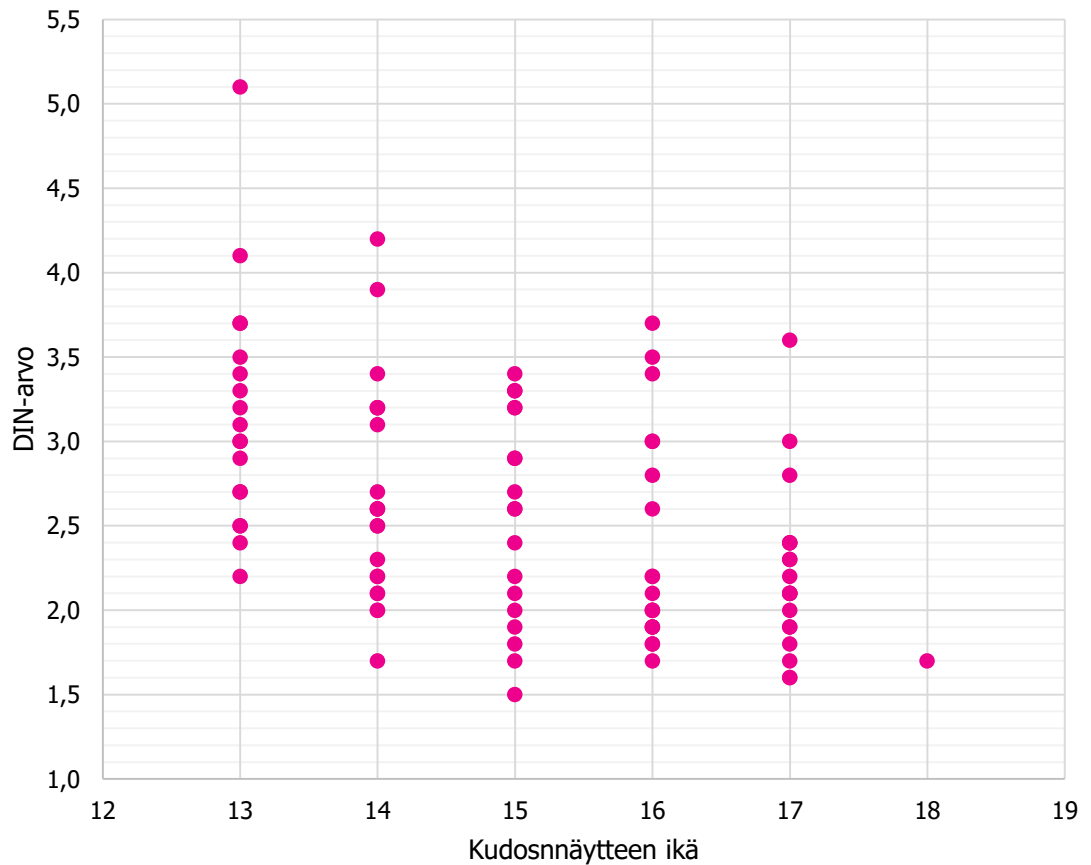


KUVIO 8. Tuumorin reunasta otettujen munuaissyöpäkudoksenäytteiden ($n=98$) DIN-arvot Proteinase K -inkubointiajan mukaan

Tuumorin reunasta otettujen näytteiden DIN-arvot jakautuivat erimittaisten Proteinase K -inkubointiaikojen välillä samalla tavoin kuin tuumorin keskeltä otetuissa näytteissä (kuvio 8). Heikoimmat DIN-arvot saatiin 22 tunnin, ja parhaat 23 tunnin Proteinase K -inkuboinnilla. 14, 18 ja 19 tunnin inkubointien DIN-arvojen välillä ei ollut juuri vaihtelua.

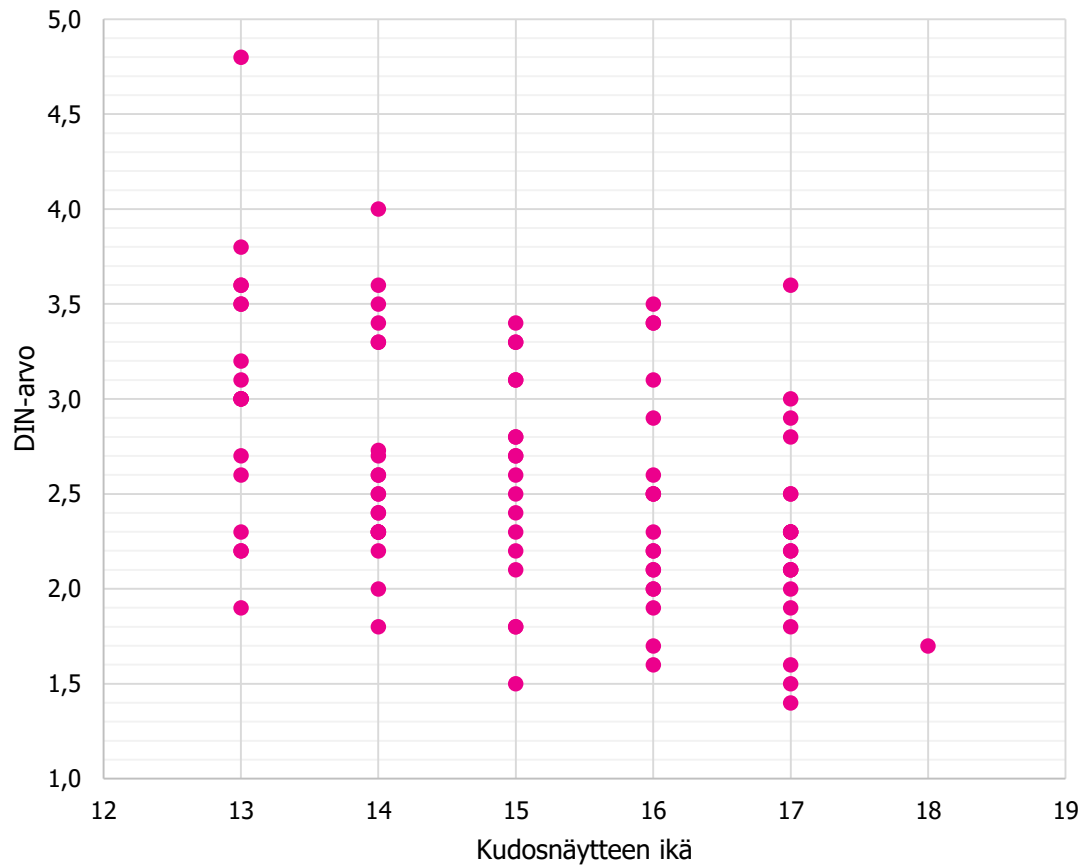
7.3.2 DNA:n eheys näytteenottokohdan ja näytteen iän mukaan

DIN-arvoista laadittiin pistekaaviot (kuvio 9 ja 10) näytteenottokohdan, tuumorin keskeltä tai reunasta, ja näytteen iän mukaan. Kaavioissa esitetään tietyn ikäisistä munuaissyöpäkudoksenäytteistä eristetyt DNA:n DIN-arvo näytteenottokehtien mukaan. Kaavion vaaka-akselilla on kudoksenäytteen ikä ja pystyakselilla DIN-arvo, joka kuvaa DNA:n eheyttä.



KUVIO 9. Tuumorin keskeltä otettujen munuaissyöpäkudosnäytteiden ($n=97$) DIN-arvot kudosnäytteen iän mukaan

Kuviosta 9 on nähtävissä, että tuumorin keskeltä otettujen näytteiden iän kasvaessa heikoimpien DIN-arvojen määrä kasvoi. Esimerkiksi 13 vuotta vanhoilla näytteillä ≤ 2 DIN-arvoja ei ollut lainkaan ja 14 vuotta vanhoillakin vain kaksi, kun taas 17 vuotta vanhoilla näytteillä DIN-arvo oli ≤ 2 viidellä näytteellä. Kuviosta havaitaan myös, että parhaimpia DIN-arvoja ($> 3,5$) oli enemmän nuoremmilla kuin vanhemmilla näytteillä.



KUVIO 10. Tuumorin reunasta otettujen munuaissyöpäkudosnäytteiden ($n=98$) DIN-arvot kudosnäytteen iän mukaan

Kuvion 10 perusteella myös tuumorin reunasta otettujen kudosnäytteiden DIN-arvojen voidaan todeta laskevan kudosnäytteen iän kasvaessa. Esimerkiksi 13 vuotta vanhoilla näytteillä DIN-arvo oli ≤ 2 vain yhdellä näytteellä, kun 17 vuotta vanhoilla näytteillä ≤ 2 DIN-arvoja oli kuudella näytteellä. Myös tuumorin reunasta otetuilla näytteillä parhaimpia DIN-arvoja ($> 3,5$) oli enemmän nuoremmilla näytteillä. Tulosten ollessa yhteneväisiä kuvioden 9 ja 10 välillä, voidaan havaita, että samanikäisillä näytteillä näytteenottoa ei ole vaikuttanut DIN-arvoihin.

8 POHDINTA

8.1 Opinnäytetyön vaiheet

Opinnäytetyöprosessi koostuu kolmesta vaiheesta: suunnittelusta, toteutuksesta ja viimeistelystä. Suunnitteluvaiheeseen kuuluvat muun muassa opinnäytetyöinfoon osallistuminen ja osittain toteutuksen kanssa päällekkäin menevä työsuunnitelman laatiminen. Toteutukseen kuuluvat esimerkiksi opinnäytetyön työstäminen ja viimeistelyyn opinnäytetyön esittäminen ja kypsyysnäyte. (Opinnäytetyön tekemisen vaiheet 2017.) Oma opinnäytetyöprojektimme käynnistyi nopealla aikataululla, koska tilaajalla oli tarve saada kehitettävä menetelmä käyttöönsä vuoden 2017 aikana ja laboratoriotyön osuus valmiiksi kevään 2017 aikana. Suunnittelu- ja toteutusvaihe menivät hieman päällekkäin.

Viimeistelyvaiheessa on selkeästi nähtävissä, miten opinnäytetyön eteneminen olisi ollut sujuvampaa: suunnitteluvaiheessa olisi täytynyt käyttää enemmän aikaa aikataulujen yhteensovittamiseen kaikkien kehittämistyöhön osallistujien kesken. Työn toteuttamisvaiheessa DNA:n eristys laboratoriossa oli riippuvainen TMA-laitteella otetuista munuaissyöpäkudosnäytteistä ja kun näytteitä ei ajoitain saatu alkuperäisten suunnitelmien mukaan, ei kaikkia DNA:n eristyksiä ehditty tekemään kevään 2017 aikana, kuten oli tarkoitus. DNA:n eristyksiä jatkettiin syksyllä, joka osaltaan viivästytti raportin kirjoittamisen aloittamista. Oman haasteensa työskentelyyn toi muut samaan aikaan olleet opinnot. Alkuperäisen aikataulun mukaan opinnäytetyö olisi valmistunut marraskuun 2017 lopussa, kun taas toteutunut valmistuminen oli maaliskuussa 2018.

8.2 Laboratoriotyöskentely

Työohjetta, jonka mukaan DNA:n eristykset munuaissyöpäkudosnäytteistä tehtiin, testattiin ennen työn aloittamista terveillä munuaiskudosnäytteillä. Näillä eristyksillä testattiin ATE-puskurin optimaalista eluutiotilavuutta 25, 30 ja 40 µl:lla, joista 40 µl valikoitui lopulliseen työohjeeseen. 40 µl tilavuudella lähes kaikki DNA irtosi spin-kolonnin kalvolta ensimmäisissä eluutiossa. Eluutiotilavuuden noston lisäksi Proteinase K:n määrää lisättiin ja Proteinase K -inkubointiaikaa pidennettiin. Nämä muutokset tehtiin ohjaajamme aikaisempien tietojen perusteella. Munuaiskudosnäytteistä tehtyjä testieristyksiä olisi kannattanut erilaisten inkubointiaikojen testaamiseksi tehdä pienemmissä sarjoissa.

Varsinaiset munuaissyöpäkudoksesta tehdyt DNA:n eristykset tehtiin laaditun työohjeen mukaan. Työssä saatujen mittaustulosten ja työn vaiheiden dokumentointi onnistui hyvin. Mittaustuloksia varten laadittu Excel-taulukko (kuva 6) mahdollisti tietojen nopean suodattamisen ja tarkastelun heti mittausten jälkeen. Mittaustulokset (liite 2) toimitettiin työn tilaajalle jokaisen DNA:n eristyskerran jälkeen, jolloin työn tilaajalla oli tarvittaessa heti mahdollisuus kommentoida tuloksia.

8.3 Tulokset

8.3.1 DNA:n eristyksen tulokset

Tulosten perusteella voidaan todeta, että QIAGENin GeneRead FFPE -kittiä voidaan tietyin muutoksin käyttää DNA:n eristämiseen TMA-laitteella otetuista munuaissyöpäkudospaloista. Noudattamalla kitin työohjetta DNA:n eristysten tulokset olisivat todennäköisesti olleet huonompia, koska ohje oli laadittu korkeintaan 10 µm paksuisille leikkeille. TMA-laitteella otetuissa kudospaloissa parafiinia ja lähtömateriaalia on enemmän kuin leikkeissä, joten kitin ohjeen mukaiset määrät Deparaffinization Solutionia ja Proteinase K:ta olisivat olleet riittämättömiä. Proteinase K -inkubointiajan muuttamisella tunnista yön yli inkubointiin pyrittiin tehostamaan Proteinase K:n vaikutusta. Proteinase K:n inkubointiaika oli 14–23 tuntia eristyskerrasta riippuen.

Eluomalla näytteet kolme kertaa varmistettiin kaiken DNA:n irronneen spin-kolonnin kalvolta jo ensimmäisessä eluutiossa. Ensimmäisen eluution näytteiden DNA:n pitoisuudet ja saannot (taulukot 1 ja 2) olivat odotusten mukaisesti korkeimpia. Myös ensisijaisten puhtausarvojen (taulukko 7) ollessa hyviä voidaan päätellä pitoisuuden ja saannot mittaustulosten kuvaavan nimenomaan DNA:n määrää näytteessä. Toisen ja kolmannen eluution pitoisuuden ja saannon mittaustulosten laskusta (taulukot 1 ja 2) voidaan huomata, että lähes kaikki DNA irtosi spin-kolonnin kalvolta ensimmäisessä eluutiossa, kuten oli tarkoitus. Puhtausarvot heikkenivät toisessa ja kolmannessa eluutiossa (taulukko 7), mistä voidaan päätellä toisessa ja kolmannessa eluutiossa olleen enemmän epäpuhtauksia, esimerkiksi hiilihydraatteja tai proteiineja kuin ensimmäisissä eluutiossa.

Opinnäytetyössämme käytettyjen FFPE-kudosten ikä ei näyttäisi vaikuttaneen eristetyn DNA:n pitoisuuteen ja saantoon (taulukot 5 ja 6). Myöskään näytteenottokehtien, tuumorin reunasta tai keskeltä, välillä ei ollut suurta eroa (taulukot 1 ja 2). Pitoisuus vaihteli tuumorin keskeltä ja tuumorin reunasta otettujen näytteiden välillä, tuumorin reunasta otettujen näytteiden pitoisuuden ja saannon ollessa hiukan korkeampia, kuin keskeltä otettujen. Watanaben ym. (2017) tutkimuksessa testattiin puolen vuoden, kolmen, kuuden, yhdeksän ja 12 vuoden ikäisiä FFPE-kudosnäytteitä ja todettiin, että kudoksen iällä ei ollut vaikutusta DNA:n pitoisuuteen ja saantoon. Työssämme Proteinase K -inkubointiajan vaikutukset eristetyn DNA:n pitoisuuteen ja saantoon olivat pieniä, tuloksista (taulukot 3 ja 4) pystyi kuitenkin havaitsemaan 18–19 tunnin inkuboinnin tuottaneen korkeimmat DNA:n pitoisuudet ja saannot.

Kudospalan näytteenottokohdalla, tuumorin reunasta tai keskeltä, ei mittaustulosten mukaan näyttäisi olleen vaikutusta DNA:n eheyteen (taulukko 8). Proteinase K -inkubointiajan vaikutusta DNA:n eheyteen on vaikea arvioida, koska saman ikäisille näytteille ei testattu kaikkia, eli 14, 18, 19, 22 ja 23 tunnin inkubointiaikoja. Vertailukelpoisten tulosten saamiseksi näytteitä olisi pitänyt inkuboida kaikilla inkubointiajoilla, jotta pystyttäisiin arvioimaan onko inkuboinnin kestolla ollut vaikutusta DIN-arvoon vai johtuvatko erot ainoastaan näytteiden iästä.

DNA:n eheydellä ja näytteen iällä näyttäisi mittaustulosten mukaan olevan yhteys, jota on kuvattu kuvioissa 9 ja 10. Tuloksista voidaan havaita DNA:n pilkkoutumisen lisääntyvän munuaissyöpäku-dosnäytteen iän kasvaessa. Koska 18 vuotta vanhoja kudosnäytteitä oli vain kaksi, ei mittaustulok-sista voida tehdä johtopäätöksiä. 13 vuotta vanhoilla näytteillä DIN-arvot olivat korkeimpia. Jungin ym. (2017) tutkimuksen mukaan DIN-arvon ollessa yli kolmen, DNA:n eheyttä pidetään NGS-sekvensoinnin kannalta riittävänä. Bassin ym. (2014) kirjallisuuskatsauksessa todetaan, että yli 10 vuotta säilytettyjen FFPE-kudosnäytteiden käyttöä DNA:n eristykseen tulisi välttää DNA:n pilkkoutu-misen vuoksi.

8.3.2 Työohje

Opinnäytetyön yhtenä tarkoituksena oli työohjeen laatiminen. Kankaanpää ja Piehl (2011) ja Torppa (2014) tuovat esille tavoitteen laatimisen ja otsikoinnin tärkeyden hyvän työohjeen kannalta. Teke-mässämme työohjeessa on kuvaava otsikko, josta selviää mitä tarkoitusta varten työohje on laadit-tu. Tavoite työohjeelle oli selkeä: alkuperäisen QIAGEN GeneRead™ DNA FFPE -kitin työohjeen muokkaaminen FFPE -munuaissyöpäku-dokselle sopivaksi.

Kankaanpää ja Piehl (2011) ja Torppa (2014) ohjeistavat laatimaan työohjeen työjärjestyksen mu-kaan. Kiinnitimme tähän erityistä huomioita työskentelyn sujuvuuden lisäämiseksi, esimerkiksi oh-jeistamalla missä työn vaiheessa lämpöblokit tulisi laittaa lämpenemään. Torpan (2014) mukaan käskymuodon käyttö helpottaa lukijaa ymmärtämään olevansa itse toimija ja tätä ohjetta nouda-timme työohjeessa.

8.4 Tulosten luotettavuus

DNA:n eristysprosessissa noudatettiin työohjetta. Työ suoritettiin huolellisesti ja poikkeamat kirjattiin rehellisesti ylös. Työssä käytettyjen reagenssien toimivuuden kannalta on oleellista, että niitä käsitel-lään valmistajan antamien ohjeiden mukaan. Osa reagensseista vaatii esivalmisteluja, kuten etanolin lisäämisen puskureihin tai reagenssin lämmittämisen tiettyyn lämpötilaan ennen käyttöä. Ilman näitä toimenpiteitä reagenssi ei pysty toimimaan tarkoitettulla tavalla ja tulokset voivat sen myötä olla vir-heellisiä. Etanolin lisääminen puskuriin merkittiin heti korkkiin, jotta tiedettiin sen olevan käyttöval-mista. Reagenssien valmistajan ohjeita säilytyslämpötiloista noudatettiin, eikä esimerkiksi pakastees-sa säilytettävää reagenssia pidetty huoneenlämmössä tarpeettomasti.

Yhtä aikaa käsiteltäviä näytteitä oli 18 kappaletta, joten tutkittavat näytteet pidettiin aina tunniste-numeron mukaisessa järjestyksessä. Jokaisen pipetoinnin jälkeen näyte siirrettiin eri riviin telineessä näytteiden sekaantumisen välttämiseksi. Työssä käytetyt pipetit olivat kalibroituja, joten niiden toi-minta oli luotettavaa. Työn tekijöinä meillä ei kuitenkaan ollut kovin paljon aikaisempaa kokemusta pipetoinnista, jolla on mahdollisesti voinut olla vaikutusta tulosten luotettavuuteen. Pipetin kärki vaihdettiin jokaisen pipetoinnin välissä, jolla pyrittiin ehkäisemään kontaminaatio näytteiden välillä. Kontaminaatioita estettiin myös säännöllisellä pintojen ja pipettien puhdistamisella.

Puhtauden ja pitoisuuden mittaamisen yhteydessä tiedot syötettiin käsin, koska laitteen ohjelmisto ei mahdollistanut niiden sähköistä kopiointia. Tämän vuoksi muutamia mittauksia jouduttiin tekemään uudelleen, koska mittaustulos tallentui väärälle tunnistenumeralle. Mittaustulokset saatiin analysaattorilta tekstitiedostona, josta ne vietiin Excel-taulukkoon. Näin toimien virheen mahdollisuus tulosten kirjaamisessa oli pieni, mutta mikäli tulokset olisivat tallentuneet suoraan Exceliin, olisivat tiedon siirtoon liittyvät riskit olleet hyvin vähäisiä. Muutamat virheelliset kirjaukset poistettiin heti mittausten jälkeen yhteenvetotaulukosta.

Mittaustulosten luotettavuus varmistettiin noudattamalla mittauslaitteiden käyttöohjeita. NanoDropin mittauspään huolellisella puhdistamisella pyrittiin estämään virheelliset mittaustulokset. Jos mittaustuloksen oikeellisuutta epäiltiin esimerkiksi absorptiokäyrän perusteella, mittaus suoritettiin uudelleen. Mikäli näytteeseen jäi ilmakupla, NanoDrop ilmoitti siitä ja myös silloin mittaus uusittiin. Tutkijan toimittaman tunnistetietolistan perusteella tehdyt tarrat tarkastettiin näyteputkeen kiinnittämisen yhteydessä toisen henkilön toimesta, jotta vältettiin mahdollisen kirjaamisvirheen päätyminen lopulliseen näyteputkeen.

DNA:n eheyttä mitattaessa varmistettiin, että näytteet olivat eppendorf-liuskan putkien pohjalla mittausten onnistumiseksi luotettavasti. Tarvittaessa liuskat sentrifugoitiin uudestaan. DNA:n eheyden mittaamisessa käytetty analysaattori mahdollisti näytteiden tietojen syöttämisen sähköisesti. Mittauksia varten oli laadittu taulukko Excelissä ilman tietojen syöttämistä käsin ja tämä vähensi näppäilyvirheen mahdollisuutta. Laitteeseen liitetyllä tietokoneella ei kuitenkaan ollut Exceliä, joten tiedot täytyi tuoda tekstitiedostona. Excel-tiedoston muuttaminen tekstitiedostoksi sisälsi muutamia vaiheita, joissa tietojen tahaton pois jääminen olisi voinut olla mahdollista. Mittaustuloksista syntyvät koosteet saatiin pdf-tiedostoina, joista tiedot syötettiin käsin yhteenvetotaulukkoon. Manuaalinen tulosten syöttäminen lisäsi virheen mahdollisuutta. Syötettyjen tulosten oikeellisuus tarkastettiin toisen henkilön toimesta.

8.5 Opinnäytetyön merkitys ja jatkotutkimusmahdollisuudet

Biopankkien tavoitteena on kerätä ja toimittaa näytteitä tutkimus- ja kehitystoimintaan (Itä-Suomen Biopankki s.a.). Itä-Suomen Biopankki voi suoraan hyödyntää työssä saatuja tuloksia ja munuaissyöpäkudoksesta eristettyä DNA:ta luovuttamalla niitä tutkimuskäyttöön. Opinnäytetyö mahdollistaa jatkotutkimuksia sekä opiskelijoille että tutkijoille.

Mahdollinen opinnäytetyön aihe voisi olla esimerkiksi näytteiden sekvensointi. Tässä opinnäytetyössä esille tullutta inkubointiajan vaikutusta eristetyn DNA:n eheyteen voisi myös selvittää tarkemmin. Mahdollisessa tutkimuksessa voitaisiin testata erimittaisten inkubointiaikojen vaikutusta saman ikäisiin näytteisiin. Eristysmenetelmää voisi testata myös nuoremmilla FFPE-munuaissyöpäkudosnäytteillä, koska tutkimusten mukaan niissä DNA:n pilkkoutuminen on vähäisempää (Bass ym. 2014). Jatkokehityksaiheena voisi myös olla RNA:n eristysmenetelmän pystytys TMA-laitteella otetuille FFPE-munuaissyöpäkudospaloille.

8.6 Opinnäytetyöhön liittyvät eettiset kysymykset

Tutkimustyön täytyy olla eettisesti luotettavaa. Sen vuoksi Tutkimuseettinen neuvottelukunta on laatinut ohjeet hyvistä tieteellisistä käytännöistä, joihin myös Savonia-ammattikorkeakoulu ja sitä myötä myös sen opiskelijat ovat sitoutuneet. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan antaman ohjeen tavoitteena on edistää hyvää tieteellistä käytäntöä niissä organisaatioissa, joissa tutkimusta harjoitetaan. Tutkimusmenetelmien tulee olla tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisia. Myös muiden tutkijoiden saavutuksia tulee kunnioittaa ja arvostaa. Hyvät tutkimuskäytännöt on muistettava myös syntyneen aineiston käsittelyssä ja raportoinnissa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje kattaa koko tutkimustyöprosessin. Sen lähtökohtia ovat muun muassa tutkimusluvan hankkiminen, rehellisyys, yleinen huolellisuus ja tarkkuus itse tutkimustyössä, mutta myös tulosten tallentamisessa, esittämisessä ja tulosten arvioinnissa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Hyvien tutkimuskäytäntöjen mukaan opinnäytetyöprosessi alkoi tutkimuslupien hankkimisella Pohjois-Savon sairaanhoitopiiriltä. Sopimukset laadittiin kaikkien opinnäytetyön tekijöiden ja Pohjois-Savon sairaanhoitopiirin välille. Tutkimuksessa käytettyjen potilasnäytteiden tunnistetietona oli näyttenumero, josta selvisi näytteenottovuosi. Tutkimuksen kannalta ei ollut tarpeellista käsitellä näytteenottovuoden lisäksi muita näytteeseen liittyviä tietoja.

Biopankkitoiminnan ja genomitiedon eettisyyttä voidaan tarkastella yleisellä tasolla esimerkiksi näytteitä luovuttavan henkilön sekä yhteiskunnan kannalta. Luovuttajan kannalta suurimmat eettiset kysymykset koskevat yksityisyydensuojaa sekä oikeutta päättää näytteiden käytöstä. Tiedot eivät saa joutua väärin käsiin ja tietojen koodaus on suoritettava niin, ettei niitä ole mahdollista yhdistää luovuttajaan ilman koodiavainta. Edellytyksenä näytteiden keräykselle on luovuttajan antama tietoinen suostumus. Vanhojen näytekokoelmien siirto biopankkien hallintaan onkin saanut kritiikkiä osakseen, sillä monet eivät välttämättä tiedä näytteidensä siirrosta julkisista ilmoituksista huolimatta. Yhteiskunnallisesti genomitiedon avulla kehitettävä yksilöllinen terveydenhoito tarjoaa mahdollisuuden edistää väestön terveyttä, ehkäistä kansantauteja sekä parantaa terveydenhuollon kustannusvaikuttavuutta. Genomitiedon hyödyntäminen terveydenhuollossa vaatii kuitenkin riittävää ymmärrystä sekä riittäviä teknisiä valmiuksia, jotta tieto olisi saatavilla oikein tulkittuna ja oikea-aikaisesti. (Carpen ja Launis 2014; Kääriäinen 2017; Saxen 2018.)

8.7 Oman työskentelyn ja oppimisen arviointi

Savonia-ammattikorkeakoulun opetussuunnitelman mukaan bioanalyytikon osaamistavoitteisiin kuuluu muun muassa eettisen osaamisen kehittyminen, johon sisältyy vastuun ottaminen omasta toiminnastaan ja sen seurauksista (Opetussuunnitelmat 2018). Laboratorio työskentelyssämme otimme huomioon, että näytteet olivat aitoja potilasnäytteitä, joten otimme vastuun siitä, että tunnistetietona olleita näyttenumeroita käsiteltiin asianmukaisesti. Lisäksi työskentelyssä oli oleellista käsitellä näytteitä siten, että ne olisivat jatkokäsittelyyn soveltuvia.

Laboratoriotyöskentelytaidot ovat tärkeä osa bioanalyytikon osaamisprofiilia. Opintoihimme on kuulunut harjoitustunteja, joiden aikana olemme päässeet harjoittelemaan laboratoriotyöhön liittyviä perustaitoja. Opinnäytetyön aikana olemme päässeet syventämään osaamistamme, esimerkiksi pipettoinnin ja laitteiden käytön osalta. Kaiken kaikkiaan käytimme laboratoriotyöskentelyyn 150 tuntia. Työ vaati ja kehitti pitkäjänteisyyttä, suunnitelmallisuutta, hyviä yhteistyötaitoja ja sitoutumista asetettuihin tavoitteisiin. Tulosten laadukas ja systemaattinen käsittely ja analysointi vaativat tietoteknisiä taitoja. Koemme, että opinnäytetyöprosessi lisäsi valmiuksiamme siirtymään työelämään.

Lisäksi opinnäytetyöprosessi kehitti tiedonhakutaitojamme sekä alaan liittyvää kielitaitoamme, sillä opinnäytetyössä käytettyjä lähteitä haettiin useista eri tietokannoista ja kolmasosa lähteistä oli englanninkielisiä. Kielitaidon kehittyminen on osa opetussuunnitelman kansainvälisyysosaamista (Opetussuunnitelmat 2018). Työssä pyrittiin käyttämään korkeintaan 10 vuotta vanhoja lähteitä, suurin osa lähteistä oli alle viisi vuotta vanhoja. Lähteiden etsinnässä käytettiin luotettavia tietokantoja, esimerkiksi PubMediä ja Oppiporttia. Osuvimpien artikkelien löytymiseksi käytettiin myös informaation tietotaitoa.

Opetussuunnitelmaan kuuluva innovaatio-osaamisemme kehittyi työn myötä. Innovaatio-osaamiseen kuuluvat muun muassa luova ongelmanratkaisutaito ja työtapojen kehittäminen (Opetussuunnitelmat 2018). Työskentely laboratoriossa suunniteltiin siten, että eristysprosessi etenisi mahdollisimman sujuvasti. Kaikille kolmelle opinnäytetyöntekijälle oli oma tehtävänsä: kaksi suoritti DNA:n eristyksen ja yhden tehtävänä oli kirjata mahdolliset poikkeamat, suorittaa mittaukset sekä laatia ja kiinnittää näytteiden tunnistetarrat. Tehtäviä vaihdettiin jokaisella eristyskerralla. Työnjako koettiin tasapuolisena ja se toi vaihtelua laboratoriotyöskentelyyn. Alussa työn suunnittelu ja aikataulutus olivat haasteellisia, koska eristämispöytä ei ollut vielä tullut tutuksi. Työn edetessä opimme huomioimaan seuraavien työvaiheiden vaatimat ennakkotoimenpiteet paremmin.

LÄHTEET

- AGILENT TECHNOLOGIES 2017. Genomic DNA Analysis ScreenTape. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-05-02.] Saatavissa: <http://www.genomics.agilent.com/en/TapeStation-DNA-RNA-ScreenTape/Genomic-DNA-Analysis-ScreenTape/?cid=AG-PT-180&tabId=AG-PR-1231>
- AITTOMÄKI, Kristiina, KÄÄRIÄINEN, Helena, MECKLIN, Jukka-Pekka ja PALVA Tiina 2013. Syöpätaudit [e-kirja]. Periytyvä alttius munuaissyövässä. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-04-06.] Saatavissa: <http://www.oppiportti.fi/op/syt00061/do>
- ANTTILA, Pirkko 2007. Realistinen evaluaatio ja tuloksellinen kehittämistyö. Hamina: AKATIIMI OY
- AURIA BIOPANKKI 2017. Tavoitteena terveyden edistäminen. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-03.] Saatavissa: <https://www.auriabiopankki.fi/kansalaisille/tavoitteena-terveyden-edistaminen/>
- BASS, Paige, ENGEL, Kelly, GREYTAK, Sarah ja MOORE, Helen 2014. A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue: How Well Do You Know Your FFPE Specimen? Archives of Pathology & Laboratory Medicine [digilehti] 138, 1520–1530. [Viitattu 2017-11-29.] Saatavissa: <http://www.archivesofpathology.org/doi/full/10.5858/arpa.2013-0691-RA?code=coap-site>
- BIOPANKKILAKI. L 2012/688. Finlex. Lainsäädäntö. [Viitattu 2017-04-20.] Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2012/20120688>
- BONO, Petri, JOENSUU, Heikki, RINTALA, Erkki ja BOSTRÖM, Peter 2013. Syöpätaudit [e-kirja]. Munuaissyövän yleisyys ja vaaratekijät. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-10-16.] Saatavissa: http://www.oppiportti.fi/op/syt00436/do?p_haku=munuaissy%C3%B6p%C3%A4#q=munuaissy%C3%B6p%C3%A4
- BÄCKSTRÖM, Pia ja VESTERINEN, Tiina 2017. Biopankit tarjoavat uusia mahdollisuuksia lääketieteelliseen tutkimukseen – kliiniset laboratoriot tärkeässä roolissa. Moodi [digilehti]. 1/2017 – 12. [Viitattu 2017-11-08.] Saatavissa: http://portfolio-web.ess.fi/www/Moodi/2017Moodi_1/#/14/
- CARPEN, Olli ja LAUNIS, Veikko 2014. Hyvä biopankki kaikille – mutta miten? Suomalainen Lääkäri-seura Duodecim [digilehti] 130, 1477–1478. [Viitattu 2018-02-14.] Saatavissa: <http://duodecimlehti.fi.ezproxy.savonia.fi/duo11766>
- DOIRON, Luke 2014. The Importance of FFPE Tissue in Oncology Research. Conversant Bio [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-03.] Saatavissa: <http://www.conversantbio.com/blog/bid/397283/the-importance-of-ffpe-tissue-in-oncology-research>
- DUODECIM 2007. Lääketieteen termit. 5. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim
- FIMLAB 2016. Munuaisten histologinen tutkimus. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-12.] Saatavissa: https://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=6596;id=15395
- FINTO 2015. Perjodihappo-Schiff-reaktio. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-12.] Saatavissa: <https://finto.fi/mesh/fi/page/?uri=http%3A%2F%2Fwww.yso.fi%2Ffonto%2Fmesh%2FD010503>
- GHATAK, S., MUTHUKUMARAN, R.B. ja NACHIMUTHU, S.K. 2013. A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. Journal of Biomolecular Techniques: JBT [digilehti] 24, 224–231. [Viitattu 2018-01-17.] Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792701/>
- HELIN, Heikki 2012. Patologia [e-kirja]. Munuaisten anatomia, diagnostiikka ja sairaudet. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-04-06.] Saatavissa: <http://www.oppiportti.fi/op/pat00502/do>
- ITÄ-SUOMEN BIOPANKKI 2017a. Henkilötietojen suoja. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-12.] Saatavissa: <http://www.ita-suomenbiopankki.fi/henkilotietojen-suoja>
- ITÄ-SUOMEN BIOPANKKI 2017b. Itä-Suomen Biopankki. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-12.] Saatavissa: <http://www.ita-suomenbiopankki.fi/ita-suomen-biopankki>

ITÄ-SUOMEN BIOPANKKI 2017c. Kudosnäytteitä biopankkiin. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-05-02.] Saatavissa: <http://www.ita-suomenbiopankki.fi/-/kudosnaytteita-siirtyi-biopankkiin?inheritRedirect=true&redirect=%2Ffi>

ITÄ-SUOMEN BIOPANKKI s.a.. Yhteistyö. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2018-02-17.] Saatavissa: <http://www.ita-suomenbiopankki.fi/yhteistyö>

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO 2017-12-08. Biopankkitutkimus käynnistyi Itä-Suomessa. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-12.] Saatavissa: <http://www.uef.fi/-/biopankkitutkimus-kaynnistyi-ita-suomessa>

ISENET 2017. Galileo TMA CK4500 computer driven. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-15.] Saatavissa: <http://www.isenet.it/product/galileo-ck4500/>

JAVANAINEN, Marika (toim.) 2016. Munuaissyöpöpotilaan opas – Munuaissyöpä ja sen hoito. Sairausten vaikutukset elämään. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-07.] Saatavissa: https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/syopa-alueelliset/sites/271/2016/10/18132752/MunuaissyopapotilaanOpas_2015.pdf

JUNG, Hyunju, JI, Sumin, SONG, Sanghoon, PARK, Yeji, YANG, Ji-Won ja SCHMIDT, Eva 2017. The DNA Integrity Number (DIN) Provided by the Genomic DNA ScreenTape Assay Allows for Streamlining of NGS on FFPE Tissue Samples. [verkkodokumentti]. [Viitattu 2017-11-27.] Saatavissa: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-5360EN.pdf>

JÄRVINEN, Petrus, TAARI, Kimmo, NISÉN, Harry ja KILPELÄINEN, Tuomas P. 2016. Pienten munuaiskasvainten ylidagnostiikasta ylihoitoon – voidaanko ketju katkaista? Duodecim. [digilehti] 132, 1420–1426. [Viitattu 2017-12-17.] Saatavissa: <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo13261.pdf>

KANANEN, Jorma 2012. Kehittämistutkimus opinnäytetyönä – Kehittämistutkimuksen kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

KANKAANPÄÄ, Salli ja PIEHL, Aino 2011. Tekstinkäsittelijän käsikirja, opas työssä kirjoittaville. Helsinki: Suomen Yrityskirjat.

KIURU, Maija 2002. Myömmille altistava geenivirhe löydetty. Duodecim [digilehti] 118, 2333-2334. [Viitattu 2018-03-15.] Saatavissa: <http://www.duodecimlehti.fi/api/pdf/duo93271>

KNUUTILA, Sakari 2012. Patologia [e-kirja]. DNA-sirumenetelmät. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-12-15.] Saatavissa: <http://www.oppiporssi.fi/op/pat00766/do>

KOSUNEN, M. 2017. Resource Use, Health Care Costs And Burden Of Disease In Patients With Polycythemia Vera In Finland: Evaluation Based On Leukocyte Counts Using Finnish Real World Data From Auria Biobank. Value In Health [digilehti] 20, 449. [Viitattu 2017-11-13.] Saatavissa: [http://www.valueinhealthjournal.com/article/S1098-3015\(17\)30903-8/fulltext](http://www.valueinhealthjournal.com/article/S1098-3015(17)30903-8/fulltext)

KÄÄRIÄINEN, Helena 2017. Genomitiedon käytön eettiset näkökohdat. Duodecim [digilehti] 133, 769-770. [Viitattu 2018-02-14.] Saatavissa: <http://duodecimlehti.fi.ezproxy.savonia.fi/api/pdf/duo13678>

KÄÄRIÄINEN, Helena ja SOINI, Sirpa 2015a. Biopankit tutkimuksen tukena. Kliinisen tutkimuksen etiikka [e-kirja]. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-04-21.] Saatavissa: <http://www.oppiporssi.fi/op/kte01200/do>

KÄÄRIÄINEN, Helena ja SOINI, Sirpa 2015b. Biopankkiaineistojen käytön periaatteet. Kliinisen tutkimuksen etiikka [e-kirja]. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2018-01-14.] Saatavissa: <http://www.oppiporssi.fi/op/kte01210/do>

LUDGATE, Jackie, WRIGHT, James, STOCKWELL, Peter, MORISON, Ian, ECCLES, Michael ja CHATTERJEER, Aniruddha 2017. A streamlined method for analysing genome-wide DNA methylation patterns from low amounts of FFPE DNA. BMC Medical Genomics [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-14.] Saatavissa: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-017-0290-1>

- LUDYGA, Natalia, GRÜNWARD, Barbara, AZIMZADEH, Omid, ENGLERT, Sonja, HÖFLER, Heinz, TAPIO, Soile ja AUBELE, Michaela 2012. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Archiv [digilehti]* 460, 131–140. [Viitattu 2017-11-13.] Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.savonia.fi/pubmed/?term=Nucleic+acids+from+long-term+preserved+FFPE+tissues+are+suitable+for+downstream>
- MATLOCK, Brian 2015. Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-23.] Saatavissa: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- McDADE WALKER, Donna 2013. Determining the Quantity, Integrity, and Molecular Weight Range of Genomic DNA Derived From FFPE Samples. American Laboratory [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-05-02.] Saatavissa: <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/144308-Determining-the-Quantity-Integrity-and-Molecular-Weight-Range-of-Genomic-DNA-Derived-From-FFPE-Samples/>
- MEDAFFCON 2017. Real World Evidence (RWE). [verkkojulkaisu]. [Viitattu: 2018-01-19]. Saatavissa: <https://www.medaffcon.fi/palvelut/rwe/>
- MÄKINEN, Markus 2012a. Patologia [e-kirja]. Kudosnäytteiden eri tyypit. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-11-07.] Saatavissa: <http://www.oppiporssi.fi/op/pat00731/do>
- MÄKINEN, Markus 2012b. Patologia [e-kirja]. Näytteiden käsittely laboratoriossa. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-04-03.] Saatavissa: <http://www.oppiporssi.fi/op/pat00732/do>
- NIENSTEDT, Walter, HÄNNINEN, Osmo, ARSTILA, Antti ja BJÖRKQVIST, Stig-Eyrik 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 18. uudistettu painos. Werner Södeström Osakeyhtiö.
- NORDCAN 2016. Association of the Nordic Cancer Registries. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-09-25.] Saatavissa: <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=290&country=246>
- OPETUSSUUNNITELMAT 2018. [Verkkoaineisto]. Sijainti: Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu [Viitattu 2018-02-17.] Saatavissa: <http://portal.savonia.fi/amk/fi/opiskelijalle/opetussuunnitelmat?yks=KS&krtid=1155&tab=2>
- OPINNÄYTETYÖN TEKEMISEN VAIHEET 2017. [Verkkoaineisto]. Sijainti: Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulun Reppu [opiskelijoiden intranet]. [Viitattu 2018-02-17.] Saatavissa: <https://reppu.savonia.fi/opinnaytetyo/amktutkinnot/Sivut/Eteneminen.aspx>
- PROMEGA 2017. DNA Purification. The basics of DNA isolation, plasmid growth and DNA quantitation. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-02.] Saatavissa: <https://fi.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/dna-purification/>
- PURSIHEIMO, Juha-Pekka 2016. Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät ja diagnostiikka. Turun yliopisto. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2018-01-17.] Saatavissa: http://www.labquality.org/LQ/pdf.aspx?dir=3&path=LQD16_Luento_Pursiheimo_Juha.pdf
- PÄÄKKÖNEN, Niina, RUOTSALAINEN, Annamari ja RUUSKANEN, Mari 2017-11-30. Näytteen käsittely patologian laboratoriossa [prosessikaavio].
- PÄÄKKÖNEN, Niina, RUOTSALAINEN, Annamari ja RUUSKANEN, Mari 2017. TapeStation elektroferogrammi [digikuva].
- PÄÄKKÖNEN, Niina, RUOTSALAINEN, Annamari ja RUUSKANEN, Mari 2017. TapeStation geelijažo [digikuva].
- PÄÄKKÖNEN, Niina, RUOTSALAINEN, Annamari ja RUUSKANEN, Mari 2017. Tulostaulukko [digikuva].
- QIAGEN 2014. GeneRead™ DNA FFPE Handbook. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-04-03.] Saatavissa: <https://www.qiagen.com/at/resources/resourcedetail?id=ee18d2c4-55d0-498a-9f02-0a4af1fd6762&lang=en>

- RAITANEN, Mika 2016. Lääkärin käsikirja [e-kirja]. Munuaissyöpä. Kustannus Oy Duodecim. [Viitattu 2017-04-03.] Saatavissa: http://www.terveysportti.fi.ezproxy.savonia.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt01868&p_haku=munuaissy%C3%B6p%C3%A4
- SALONEN, Kari 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Opas opiskelijoille, opettajille ja TKI-henkilöstölle. Turun Ammattikorkeakoulu. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-12.] Saatavissa: <http://julkaisut.turkuamk.fi/isbn9789522163738.pdf>
- SAXEN, Heikki 2018. Geenitutkimuksen tukirakenteita rakennetaan lainsäädännössä. Lääkärilehti [digilehti] 6, 322. [Viitattu 2018-02-14.] Saatavissa: <http://www.laakarilehti.fi.ezproxy.savonia.fi/ajassa/paakirjoitukset-tiede/geenitutkimuksen-tukirakenteita-rakennetaan-lainsaadannossa/>
- SOLUNETTI, 2006a. Solubiologia. Sekvensointi. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-15.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sekvensointi/2/>
- SOLUNETTI, 2006b. Solubiologia. Geenit. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-12.] Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/geenit/2/>
- SUOMEN BIOPANKIT 2017a. Biopankkien esittely. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-30.] Saatavissa: <https://www.biopankki.fi/biopankkien-esittely/>
- SUOMEN BIOPANKIT 2017b. Mikä on biopankki? [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-11-30.] Saatavissa: <https://www.biopankki.fi/mika-on-biopankki/>
- SUOMEN BIOPANKIT 2017c. Osallistuminen biopankkitutkimukseen. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-03-17.] Saatavissa: <http://www.biopankki.fi/osallistuminen-biopankkitutkimukseen/>
- SUOMINEN, Ilari, PÄRSSINEN, Raimo, HAAJANEN, Kari ja PELKONEN, Jani 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.
- SYÖPÄJÄRJESTÖT 2017. Mikä on syöpä? [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-03.] Saatavissa: <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/mika-on-syopa/>
- TALVINEN, Kati 2010. The application of cDNA and tissue microarray methods in the study of human carcinomas. [väitöskirja]. [Viitattu 2017-12-15.] Saatavissa: <http://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/64266/AnnalesD924Talvinen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- TERVEYDEN JA HYVINVOINNIN LAITOS 2014. Syövän yleisyys. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-03.] Saatavissa: <https://www.thl.fi/fi/web/kansantaudit/syopa/syovan-yleisyys>
- THERMO FISHER SCIENTIFIC 2010. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual. [verkkodokumentti]. [Viitattu 2017-11-21.] Saatavissa: <http://nanodrop.w01.wh-2.com/Library/nd-1000-v3.8-users-manual-8%20x11.pdf>
- THERMO FISHER SCIENTIFIC 2017. User Guide: RNase A, DNase and Protease-free. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-12-13.] Saatavissa: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0531>
- TIETOSUOJAVALTUUTETUN TOIMISTO 2017. EU:n tietosuojauudistus. [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2018-01-29.] Saatavissa: <http://www.tietosuoja.fi/fi/index/euntietosuojauudistus.html#mitenvalmistautatietosuoja-asetukseen>
- TORPPA, Tiina 2014. Työssään kirjoittavan opas. Helsinki: Talentum Media Oy.
- TUTKIMUSEETTINEN NEUVOTTELUKUNTA 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-04-03.] Saatavissa: http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

VISAPÄÄ, Harri 2003. Tissue biomarkers in cancer of the urinary bladder and kidney. High-throughput tissue microarrays in the study of urinary tract malignancies. [väitöskirja]. [Viitattu 2017-12-15.] Saatavissa: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/22655/tissuebi.pdf?sequence=2>

WATANABE, Mototsugu, HASHIDA, Shinsuke, YAMAMOTO, Hiromasa 2017. Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods. *Experimental and Therapeutic Medicine* [digilehti] 14, 2683–2688. [Viitattu 2017-10-02.] Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609301/>

ZONTA, Eleonora, NIZARD, Philippe ja TALY, Valerie 2015. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. *Advances in Clinical Chemistry* [digilehti] 70, 197–246 . [Viitattu 2017-11-14.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065242315000207?via%3Dihub>