



Oikarinen Virve ja Räsänen Laura

OGG1-KORJAUSENTSYYMIN PAIKANTAMINEN KARSINOGEENISESTÄ RIN- TAKUDOKSESTA POLYMEERITEKNIKALLA

OGG1-KORJAUSENTSYYMIN PAIKANTAMINEN KARSINOGEENISESTÄ RINTAKUDOKSESTA POLYMEERITEKNIKKALLA

Virve Oikarinen ja Laura Räsänen
Opinnäytetyö
Kevät 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Virve Oikarinen ja Laura Räsänen
Opinnäytetyön nimi: OGG1-korjausentsyymien paikantaminen karsinogeenisestä rintakudoksesta polymeeritekniikalla
Työn ohjaajat: Mäkitalo Outi ja Reponen Paula
Työn valmistusluku- ja vuosi: Kevät 2011 Sivumäärä: 31 + 5 liitettä

TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyömme aiheena on OGG1-korjausentsyymien (8-oxoguaaniini-glykosylaasi) paikantaminen rintasyöpäkudoksista valmistetuista histologisista kudosleikkeistä. Tutkimus tehdään Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laitokselle. Suoritamme värjäyksen Novolink™-polymeeritekniikan menetelmän mukaan. Polymeeritekniikkaan perustuvia menetelmiä on kahdenlaisia. Käyttämässämme Envision™-menetelmässä käytetään sekundaarivasta-ainetta, joka on spesifinen hiiren ja kanin anti-IgM-vasta-aineille.

Tavoitteenamme oli selvittää optimaalisin vasta-ainelaimennos, kudoksen esikäsittely ja vasta-aineen inkubaatioaika. OGG1-entsyymi on spesifinen 8-OH-G-mutaatioita DNA:sta pois leikkaava DNA-korjausentsyymi, jota OGG1-geeni tuottaa. Ihmissolussa OGG1-geeni sijaitsee kromosomissa 3p25 ja koodaa OGG1-entsyymien kahta erilaista muotoa, jotka ovat α -OGG1 ja β -OGG1. OGG1-korjausentsyymien paikantaminen polymeeritekniikalla onnistuu suhteellisen hyvin, mutta vaatii vielä lisää kokeilukertoja.

Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laitoksella parhaat värjäystulokset saatiin, kun vasta-ainelaimennos oli 1/500 ja inkubaatioaika 24 tuntia. Lupaavat tutkimustulokset antavat aiheetta olettaa, että OGG1-korjausentsyymien paikantaminen polymeeritekniikan avulla voidaan lähitulevaisuudessa ottaa rutiinikäyttöön immunohistokemian laboratoriossa. Suoritettuamme oman osuutemme laboratoriotöistä huomasimme useita jatkotutkimusmahdollisuuksia: värjäyksissä voisi kokeilla esikäsittelynä inkubointia trypsiiniliuoksella nyt käyttämämme pepsiiniliuoksen sijaan. Myös 12 tunnin inkubaatioaikaa kannattaisi kokeilla, koska ongelmana oli useasti liiallinen taustavärjäytyminen, joka voi mahdollisesti johtua pitkästä inkubaatioajasta. Tutkimusryhmän aloittama tutkimusta on jo jatkettu Oulun yliopiston patologian laboratoriossa.

Asiasanat: OGG1-korjausentsyymi, 8-OHG-mutaatio, polymeeritekniikka, immunohistokemia, kudosleike

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Virve Oikarinen and Laura Räsänen

Title of thesis: Localization of the OGG1-repair enzyme on carcinogenic breast tissues with polymer technique

Supervisors: Mäkitalo Outi and Reponen Paula

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2011 Number of pages: 31 + 5 appendices

ABSTRACT

The topic of our thesis is localization of the OGG1-repair enzyme (8-oxoguanine-glycosylase) on carcinogenic breast tissues with polymer technique. The research was done for the Department of Pathology of Oulu University Hospital.

We perform the OGG1-repair enzyme localization with Novolink™-polymer technique. There are two polymer-based techniques. We used Envision™-technique which utilizes secondary antibody. Our aim was to find out the optimal antibody dilution, tissue prehandling and incubation time of the antibody. OGG1 enzyme produced by OGG -gene is a specific enzyme that removes 8-OH-G-mutation from the DNA. In human cells OGG1 gene is localized in chromosome 3p25 which encodes two different types of OGG1 enzyme; α -OGG1 and β -OGG1.

We succeeded in the localization of OGG1-repair enzyme with polymer technique quite well. But it still needs more testing. We got our best localization results with 1/500 antibody dilution and 24 hours incubation time. Promising test results give hope to assume that the localization of OGG1-repair enzyme with polymer technique can be taken for routine use in immunohistochemical laboratories in the near future. After our part of the research was done, we discovered many possibilities for further testing; for example prehandling with trypsin and 12 hours incubation time. The research that we started has already been continued in Oulu University Department of Pathology.

Keywords: OGG1-repair enzyme, 8-OHG-mutation, polymer technique, immunohistochemistry, tissue section

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ.....	3
ABSTRACT.....	4
1 JOHDANTO.....	6
2 OKSIDATIIVISEN STRESSIN VAIKUTUS KARSINOGENEESIIN.....	8
2.1 OGG1-korjausentsyymi.....	8
2.2 8-hydroksiguanosiini.....	9
3 HISTOLOGISTEN MENETELMIEN VAIKUTUS KUDOSNÄYTTEEN LAATUUN.....	11
3.1 Kudosnäytteiden fiksaatio.....	11
3.2 Kudoskuljetuksen vaiheet histologisessa prosessissa.....	11
3.3 Antigeenin paljastukseen vaikuttavat tekijät.....	13
4 IMMUNOHISTOKEMIAALLISIA MENETELMIÄ.....	14
4.1 Entsyymi-immunohistokemia.....	14
4.2 Polymeeritekniikkaan perustuva immunohistokemia.....	15
5 TUTKIMUSTEHTÄVÄT.....	17
6 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN.....	18
6.1 Novolink™-polymeerikitin periaate työvaiheineen.....	18
6.2 Kontrollien käyttö.....	19
7 TUTKIMUSTULOKSET.....	21
8 POHDINTA.....	26
LÄHTEET.....	28
LIITTEET.....	31

1 JOHDANTO

Korjausentsyymejä pidetään yhtenä tehokkaimmista suojista syöväälle altistavia happiradikaaleja vastaan (Karihtala 2005, 17). Yksi tunnetuista korjausentsyymeistä on OGG1 eli 8-oxoguaaniiniglykosylaasi (Wu, Chou, Chang & Wu 2003, 1.), joka liittyy opinnäytetyöhömme kiinteästi, sillä aiheemme on OGG1-korjausentsyymien paikantaminen polymeeritekniikalla rintasyöpänäytteistä. Tutkimus tehdään Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laitokselle. Opinnäytetyömme tarkoituksena on paikantaa OGG1-korjausentsyymi rintasyöpäkudoksista valmistetuista histologisista kudosleikkeistä. OGG1-korjausentsyymi pyritään paikantamaan immunohistokemiallisen värjäyksen avulla. Meidän osuutemme tässä tutkimuksessa on kudosleikkeiden leikkaaminen ja immunohistokemiallisen värjäyksen suorittaminen patologian laitoksen laboratorioissa.

Rintasyöpä on yksi yleisimmistä naisten syövästä (Vehmanen, hakupäivä 12.12.2009). Uusimmista tutkimuksissa on nostettu esille yhdeksi tärkeimmistä syöpään sairastumiseen johtavista syistä vapaiden happiradikaalien (liite 1) tuotanto. Vapaat happiradikaalit voivat aiheuttaa mutatoivia DNA-vaurioita. (Wu ym. 2003, 1–9.) Oksidatiivinen stressi tarkoittaa sitä, että elimistön vapaiden radikaalien ja antioksidanttien suhde pyrkii muuttumaan ihanteellisesta tilastaan hapettuneeseen suuntaan. Tähän voi olla syynä antioksidanttien puute tai vapaiden radikaalien ylituotanto. Antioksidantit ovat yhdisteitä, jotka estävät, viivyttävät tai poistavat kokonaan tai osittain vapaiden happiradikaalien aiheuttamia vaurioita. (Saastamoinen, hakupäivä 10.11.2009.)

Kun oksidatiivinen stressi vaikuttaa soluun, syntyy mutaatioita, joista yksi on 8-hydroksiguanosiinin (8-OH-G) aiheuttama mutaatio (Wu ym. 2003, 1–9). 8-OH-G:tä voidaan pitää karsinogeeninä, mikä johtuu sen alltiudesta aiheuttama DNA:han GC→TA-mutaatioita (Kasai 1997, 154–156). OGG1 on spesifinen 8-OH-G-mutaatioita pois leikkaava DNA-korjausentsyymi (Wu ym. 2003, 1–9).

Suoritamme OGG1-korjausentsyymien paikantamisen Novolink™-polymeerikitin menetelmän mukaan. Tavoitteenamme on värjäysten suorittamisen lisäksi selvittää optimaalisin vastaainelaimennos, kudoksen esikäsitteily ja vasta-aineen inkubaatioaika. Värjäytymisen onnistumisen

arvioi patologi. Tätä tutkimusta voidaan hyödyntää rintasyöpädiagnostiikassa ja rintasyöpäpotilaiden ennusteen arvioinnissa. Patologian laitoksen immunohistokemian laboratorio hyöttyy opinnäytetyöstämme siten, että he voivat mahdollisesti tulevaisuudessa ottaa OGG1-korjausentsyymien paikantamisen polymeeritekniikalla rutiinikäyttöön. Lisäksi tuotamme uutta tutkimustietoa immunohistokemian alalle.

2 OKSIDATIIVISEN STRESSIN VAIKUTUS KARSINOGENEESIIN

Vaikka useita riskitekijöitä syöpien kehittymiselle on tiedossa, on syöpien synnyn perimmäinen syy yhä selvittämättä. Syövän perussyntymekanismeja voidaan ajatella olevan kuusi. Nämä ovat: solujen tottelemattomuus kasvutekijöiden välittämiä säätelyviestejä kohtaan, solujen jakautumisvauhdin kiihtyminen, solujen kyky jakautua loputtomasti, ohjelmoidun solukuoleman toimimattomuus, kasvainsolukon muodostamat uudisverisuonet sekä kasvainsolukon lähettämät etäpesäkkeet. (Laiho & Latonen, Hakupäivä 26.3.2010.) Viime vuosina syöpien etiologisia tekijöitä yhdistäväksi tekijäksi on nostettu vapaiden radikaalien tuotanto (Dreher & Junod 1996, 30). Vapailla radikaaleilla on atomissa uloimmalla kuorellaan pariton elektroni, jonka vuoksi radikaaliyhdisteet ovat erittäin reaktiivisia ja voivat aiheuttaa suoria letaaleja tai mutatoivia DNA-vaurioita, häiritä solun signaalintijärjestelmiä tai apoptoosia sääteleviä järjestelmiä. Siten vapailla radikaaleilla oletetaan olevan keskeinen osa syöpien kehitymisessä. (Karihtala 2005, 24–25.) Vapaat happiradikaalit vahingoittavat solujen makromolekyylejä ja heikentävät solun toimintoja sekä lyhentävät elinikää. Vapaista happiradikaaleista suuri osa on lähtöisin mitokondrioista. (Bjørheim 2005, 125.)

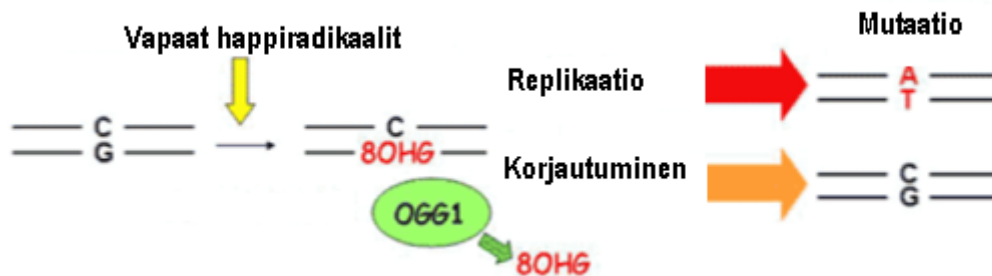
Suojautuakseen hapen toksisilta vaikutuksilta ovat solut kehittäneet happiradikaaleja vastaan puolustusmekanismeja, joista tehokkaimpina pidetään antioksidatiivisia entsyymejä. (Karihtala 2005, 24–25.) Tieteellinen kiinnostus vapaita radikaaleja ja antioksidatiivisia entsyymejä kohtaan on kasvanut viime vuosina erityisesti syövän tutkimuksessa. Soluihin syntyy oksidatiivinen stressitilanne, kun vapaiden radikaalien määrä kasvaa soluissa huomattavasti. (Dreher & Junod 1996, 32–35) Tilanteelle on tyypillistä myös se, etteivät antioksidatiiviset entsyymit indusoidu riittävästi. Oksidatiivisella stressillä on osoitettu olevan selkeä karsinogeeninen vaikutus sekä *in vitro* että *in vivo*. (Karihtala & Soini 2007, 81.) Vapaiden radikaalien aiheuttamia vaurioita kohdekudoksissa voidaan niiden äärimmäisen lyhyen puoliintumisajan vuoksi luotettavimmin mitata erityisillä oksidatiivisen stressin markkereilla (Kasai 1997, 161).

2.1 OGG1-korjausentsyymi

OGG1-korjausentsyymi on spesifinen 8-hydroksiguanosiinimutaatioita (8-OH-G-mutaatioita) DNA:sta pois leikkaava entsyymi, jota OGG1-geeni tuottaa (Wu ym. 2003, 1–9). Ihmissolussa OGG1-geeni sijaitsee kromosomissa 3p25 ja koodaa OGG1-korjausentsyymien kahta erilaista muotoa, jotka ovat α -OGG1 ja β -OGG1. α -OGG1 esiintyy tumassa, kun taas β -OGG1 sijaitsee

mitokondriossa. OGG1-geenillä ei ole mutatoivaa vaikutusta, mutta inaktivoituessaan se saattaa vauhdittaa karsinogeneesiä. Bakteri- ja hiivasoluilla tehtyjen kokeiden perusteella voi olettaa, että OGG1-korjausentsyymi kykenee korjaamaan GC→TA-vaurioita myös ihmisen DNA:sta. Näiden kokeiden johdosta on tutkittu, löytyykö ihmisen syöpäkasvaimista mutaatiota OGG1-geenissä. (Boiteux & Radicella 2000, 1, 5–7.)

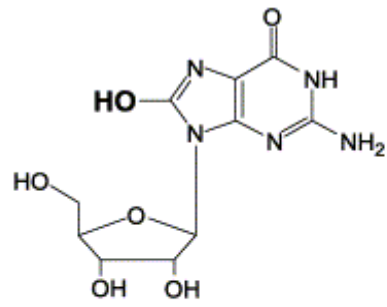
Kuten seuraavasta kaaviosta (kuvio 1) käy ilmi, GC-emäspari mutatoituu happiradikaalien vaikutuksesta ja replikaatiossa kyseisen emäsparin tilalle tulee AT-emäspari. OGG1-korjausentsyymi korjaa tämän mutaation takaisin alkuperäiseen muotoonsa.



KUVIO 1: Happiradikaalien aiheuttama mutaatio DNA:n emäsparissa GC (Mukaillen www.ncc.go.jp- sivustolta otettua kuvaa.)

2.2 8-hydroksiguanosiini

8- hydroksiguanosiini (8-OH-G) on markkeri, jolla voidaan mitata oksidatiivisen stressin aiheuttamien mutaatioiden määrää DNA:ssa (Nishimura 2002, 813). 8-OH-G:n määrittäminen kertoo siis guanosiinimäksen hapettumisvaurioista. Tämän lisäksi 8-OH-G on myös karsinogeeni, mikä johtuu sen alttiudesta aiheuttaa DNA:han GC→TA-vaurioita, jotka ovat tavallisimmin p53-mutaatioissa. (Kasai 1997, 154–156.) P53 on on solusykliä säätelevä kasvurajoitteeni (Boiteux & Radicella 2000, 6), jolla on keskeinen osa syöpäkasvainten synnyn ehkäisyssä. P53-geeni osallistuu solusyklin säätelyyn pysäyttämällä solusyklin G1-vaiheeseen, mikäli DNA on vaurioitunut. Karsinogeneesissä syöpägeenien aktivoitumisen lisäksi jonkun tai useampien solun kasvua rajoittavista geeneistä täytyy lakata toimimasta. (Levine & Finlay 2004, 67–69.) Kuviosta kaksi käy ilmi 8-OHG:n rakennekaava.



**8-Hydroksiguanosiinin
(8-OH-G) rakenne**

KUVIO 2: 8-OH-G:n rakennekaava. (Mukailen Wu ym. 2003, 2.)

3 HISTOLOGISTEN MENETELMIEN VAIKUTUS KUDOSNÄYTTEEN LAATUUN

Jotta kudospelkeitä voidaan tarkastella mikroskoopilla, täytyy ne fiksoida ja imeyttää hyvin leikautuvaan tukiaineeseen tai jäädyttää. Kun leikkeet on kiinnitetty objektilasille ja värjätty halutulla värjäysmenetelmällä, niistä voidaan mikroskooppisesti arvioida kudoksen rakennetta. Värjäysten avulla saadaan erotettua eri kudskomponentit toisistaan. (Rantala, Naukkarinen & Helin 1998, 65.)

3.1 Kudospelteiden fiksaatio

Kun kudospala irrotetaan luonnollisesta ympäristöstään, alkaa sen hajoaminen välittömästi. Lysoosomaaliset entsyymit, hapen puute ja hajoamisprosessi ovat uhka kudoksen säilymiselle. (Renshaw 2007, 47.) Fiksoinnin tarkoituksena on estää solun omien entsyymien ja bakteerien toiminta ja siten estää kudoksen hajoaminen (Rantala ym. 1998, 65). Myös tärkeää on kudoksen fysikaalisten ominaisuuksien säilyttäminen mahdollisimman pienin muutoksin rutiinikuljetusta varten. Tärkein edellytys laadukkaalle histologiselle näytteelle on riittävä fiksoiminen. (Luna 1968, 1.) Fiksaatiossa on kyse pääasiassa proteiinien kiinnittämisestä, koska proteiinit muodostavat solujen pääasiallisia makromolekulaarisia komponentteja. Fiksatiivin avulla kudoksen proteiineja saadaan denaturoitua, saostettua tai proteiineihin muodostettua poikkisidoksia. (Bancroft & Stevens 1990, 22.) Suomessa kudospeljetuksessa käytetään yleisimmin fiksoimisaineena formaliinia, joka on formaldehydikaasun kymmenprosenttinen vesiliuos (Rantala ym. 1998, 65–66).

Fiksointiin vaikuttavia tekijöitä ovat pH, lämpötila, fiksaatioaika, kudospelkaleen koko ja fiksaatiivin konsentraatio. Fiksaatioliuoksen tulisi olla mahdollisimman lähellä fysiologista tilaa eli pH 6–8. Kudospelkkeet fiksoidaan yleensä huoneen lämmössä, mutta +4 °C olisi fiksointiin ihanteellisin lämpötila. Erityisesti entsyymihistokemia edellyttää jääkaappilämpötilaa. Kudospelkkeen suuri koko vaikeuttaa ja hidastaa fiksointia. (Rantala ym. 1998, 67.)

3.2 Kudospeljetuksen vaiheet histologisessa prosessissa

Kudospeljetus on kudospelsoinnin vaihe, johon kuuluvat huuhtelu, veden poisto, kirkastaminen ja tukiaineen imeytys. Tämän jälkeen kudospelteistä valetaan parafiiniblokkeja, joista leika-

taan kudokset leikataan mikrotomilla. Leikkauksen jälkeen kudokset värjätään halutulla värjäysmenetelmällä. (Bancroft & Stevens 1990, 43–48.)

Huuhtelu

Ylimääräinen ja kudoksiin löysästi sitoutunut formaliini saadaan poistettua kudoksenäytteestä huuhtelemalla sitä vedellä tai alkoholilla. Huuhtelu ei kuitenkaan ole välttämätön, vaan joissakin kuljetusohjelmissa kudokset siirretään formaliinista suoraan 75-prosenttiseen etanoliin. Huuhtelun jälkeen tulisi kudoksen rakenteisiin sitoutumaton vesi saada poistettua. (Bancroft & Stevens 1990, 43–48; Rantala ym. 1998, 67–68.)

Vedenpoisto

Vedenpoistoon eli dehydraatioon on mahdollista käyttää kahta erilaista menetelmää. Yleisimmin käytetään nousevaa alkoholisarjaa, jossa alkoholin pitoisuus nousee asteittain. Dehydraatio voidaan suorittaa myös muiden vettä sitovien kemiallisten aineiden avulla. Etanoli on hyvä veden siirtoaine, mutta sen haittana on sen kudosta kutistava ominaisuus. Nousevassa alkoholisarjassa kudokset kuljetetaan etanolipitoisuudeltaan pienemmästä suurimpaan ja lopuksi käytetään absoluuttista etanolia imeyttämään kudokset täysin vedettömiksi. (Bancroft & Stevens 1990, 43–44; Rantala ym. 1998, 68.)

Kirkastus

Kirkastuksella tarkoitetaan dehydroivan aineen poistamista kudorakenteista, jotta kudokset olisivat valmiina tukiaineen imeyttämistä varten. Kirkastus on siis alkoholin poistamista. Kudokset ovat kirkastuksen jälkeen kirkkaamman näköisiä ja läpikuultavia, koska dehydroiva aine on korvattu tukiaineen liuottimella. (Bancroft & Stevens 1990, 47.) On tärkeää, että kirkastukseen käytettävä aine sekoittuu sekä dehydroivan että tukiaineen kanssa (Rantala ym. 1998, 68).

Tukiaineen imeytys

Kudokset kyllästetään tukiaineella, joka yleisimmin on parafiini. Kirkastusaine poistuu kudoksista tukiaineen imeytymisen aikana. Jotta kudoksen kiderakenne säilyisi halutun kaltaisena, kirkastusainetta ei saa jäädä tukiaineeseen. Ollessaan nestemäisessä olomuodossa parafiini tunkeutuu kudokseen ja jähmettyessään se kiinteytyy kudoksessa, eikä aiheuta yleensä kudovaurioita. (Hayat 2002, 65–69.) Ehjät, sileät ja mielellään 3–4 µm paksuiset leikkeet ovat ehdoton edellytys värjäysten onnistumiselle (Naukkari & von Boguslawsky 1998, 150; Farmilo & Stead 2006, 32).

3.3 Antigeenin paljastukseen vaikuttavat tekijät

Fiksaatioissa proteiini-molekyylien muoto muuttuu, minkä vuoksi vasta-aineet eivät kykene tunnistamaan niitä. Antigeenien paljastusmenetelmillä palautetaan proteiinin alkuperäinen rakenne, jolloin antigeenit ja epitootit paljastuvat. Tämä mahdollistaa vasta-aineiden kiinnittymisen epitoppeihin. (Renshaw 2007, 48; Hayat 2002, 72–73.)

Fiksaatio on tärkein antigeenin paljastukseen vaikuttava tekijä, ja siten fiksatiivityyppi, fiksaation kesto ja lämpötila vaikuttavat oleellisesti paljastamisen onnistumiseen (Shi, Cote, & Taylor 1997, 327–328). Fiksaation jälkeen proteiinien kemialliset ominaisuudet ja antigeenien toiminnot eroavat suuresti alkuperäisistä, millä on erittäin suuri merkitys erityisesti antigeenien ja vasta-aineiden välisissä reaktioissa (Renshaw 2007, 48). Kymmenprosenttinen formaliini paljastaa antigeenin tehokkaimmin (Hayat 2002, 71). Fiksaatio kiinnittää tehokkaasti antigeenit paikalleen, mutta samalla muuttaa epitoppien muotoa ja näin vaikeuttaa vasta-aineiden tunkeutumista niiden luo. Vaatimukset ovat ristiriidassa keskenään, sillä tehokkaan fiksatiivin tulisi säilyttää kudost morfologia ja antigeenisuus sekä estää antigeenin siirtyminen ja diffuusiointi kudoksesta värjäyksen aikana. Hyvä fiksatiivi ei saisi vaikeuttaa antigeeni-vasta-ainekompleksin syntymistä. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 148.)

Antigeenien paljastaminen voidaan suorittaa joko entsyymien avulla tai kudostleikettä lämmittämällä. Tärkeitä tekijöitä antigeenin paljastuksessa lämmityksen avulla ovat lämpötila, lämpötilan muutokset sekä lämmityksen kesto. (Hayat 2002, 73, 124.) Mikroaaltouunilämmitys on yleisin vaihtoehto formaliinifiksoiduille kudostnäyteille (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150–151). Lämpökäsittelyn seurauksena suurin osa antigeeneistä on havaittavissa (Hayat 2002, 73, 124). Entsyymikäsitteltyjen kudosten solumorfologia ei ole yhtä hyvä kuin lämpökäsitteltyjen. Lämmittäminen tehdään yleensä 100 °C:ssa mikroaaltouunissa 10 minuutin ajan. Lämmityksessä käytetään sitraattipuskuria, jonka pH on 6. (Hayat 2002, 74, 124–125.)

Paljastamattomien antigeenien immunoreaktiivisuus saadaan palautettua proteolyttisellä entsyymikäsittelyllä. Optimaalisin entsyymikäsittely on testattava jokaiselle antigeenille erikseen, mutta joidenkin antigeenien reaktiivisuuden se tuhoaa kokonaan. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150.)

4 IMMUNOHISTOKEMIAALLISIA MENETELMIÄ

Immunohistokemia on antigeenin osoittamista kudoksetä, sille spesifisellä vasta-aineella. Jotta sitoutumisreaktio saadaan mikroskoopissa havaittavaksi, täytyy käyttää erilaisia merkkiaineita. Merkkiaineet liitetään sellaisenaan vasta-aineeseen joko leimaamalla ne suoraan tai käyttämällä monivaiheista leimausmenetelmää. (Naukarinen & Von Boguslawsky 1998, 133.) Antigeeni on molekyyli, joka tunnustetaan kudoksesta spesifisen vasta-aineen avulla. Epitoppi eli determinantti on se osa antigeeniä, johon vasta-aine sitoutuu. (Bettelheim, Brown, Campbell & Farrell 2007, 781.)

Vasta-aine eli immunoglobuliini on plasmasolun tuottama proteiini, joka tunnustaa antigeenejä ja sitoutuu niihin (Penttilä 2004, 395, Naukarinen & Von Boguslawsky 1998, 134). Immunoglobuliinit muodostavat viisi pääluokkaa: IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE. Nämä koostuvat kahdesta samanlaisesta raskaasta ketjusta ja kahdesta identtisestä kevyestä ketjusta. (Boenisch 2006, 1.) Immunohistokemiassa yleisimmin käytetty vasta-aine on IgG, mutta myös IgM-luokan vasta-aineita käytetään. Primaarivasta-aine on spesifinen antigeenille. Sekundaarivasta-aine sitoutuu primaarivasta-aineeseen. Sen pitää olla muodostunut sen eläimen immunoglobuliinia vastaan, jossa primaarivasta-aine on muodostunut. Vasta-aineita tunnetaan kahta päätyyppiä: poly- ja monoklonaalisia. (Bancroft & Cook 1994, 263, Naukarinen & Von Boguslawsky 1998, 134–135.) Polyklonaalinen vasta-aine on useamman vasta-aineen seos, jossa vasta-aineet tunnustavat useita eri epitoppeja antigeenistä. Monoklonaalinen sitä vastoin tunnustaa vain tietyn spesifisen epitopin. (Boenisch 2006, 5–6.)

4.1 Entsyymi-immunohistokemia

Entsyymi-immunohistokemiallisissa menetelmissä antigeeni-vasta-ainekompleksin visualisointi tapahtuu entsyymaattisen reaktion kautta (Bancroft & Stevens 1990, 381). Käytettäessä entsyymejä merkkiaineena saadaan aikaiseksi saostuma. Saostuma näkyy tavallisessa valomikroskooppissa värillisenä ilmiönä. Saostuma syntyy, kun käytettävä entsyymi reagoi substraattinsa ja sopivan väriaineen kanssa. Piparjuuresta eristetty peroksidaasi on yleisin merkkiaineena käytetty entsyymi. Sen substraattina käytetään vetyperoksidia ja erilaisilla kromogeeneillä saadaan aikaan haluttu värireaktio. Yleisin kromogeeneistä on 3,3'-diaminobentsidiinitetrahydrokloridi (DAB). Se muo-

dostaa kudოსleikkeeseen mikroskoopissa näkyvän ruskean sakan. (Naukkariinen 2000, 149)

4.2 Polymeeritekniikkaan perustuva immunohistokemia

Vaikka monet (strept)avidini-biotiini menetelmät ovat vielä yleisesti laboratoriokäytössä, on näille menetelmille useita rajoituksia. Endogeenisen biotiinin esiintyminen kudoksissa johtaa merkittävään leikkeen taustavärjäytymiseen tietyissä oloissa. Kudოსleikkeen formaliinifiksaatio ja parafiinipetaus ovat vähentäneet huomattavasti endogeenisen biotiinin esiintymistä, mutta eivät ole poistaneet sitä kokonaan tietyistä kudostyypeistä. Myös lämpökäsittely antigenein paljastusmenetelmänä saattaa aiheuttaa endogeenisen biotiinin ei-toivottua esiintymistä. Endogeenisen biotiinin sitoutumista estävät menetelmät ovat melko tehokkaita, mutta tekevät jo valmiiksi monimutkaisesta menetelmästä vieläkin haastavamman. Näiden useiden rajoitusten vuoksi biotiinin käyttöön perustuvien menetelmien suosio on vähentynyt, kun taas polymeeritekniikkaan perustuvat immunohistokemialliset menetelmät ovat saavuttaneet suosiota. Nämä menetelmät hyödyntävät polymeerirunkoon perustuvaa teknologiaa, jossa useita vasta-aineita ja entsyymimolekyylejä on sidottu polymeeriin kiinni. (Key 2006, 50.)

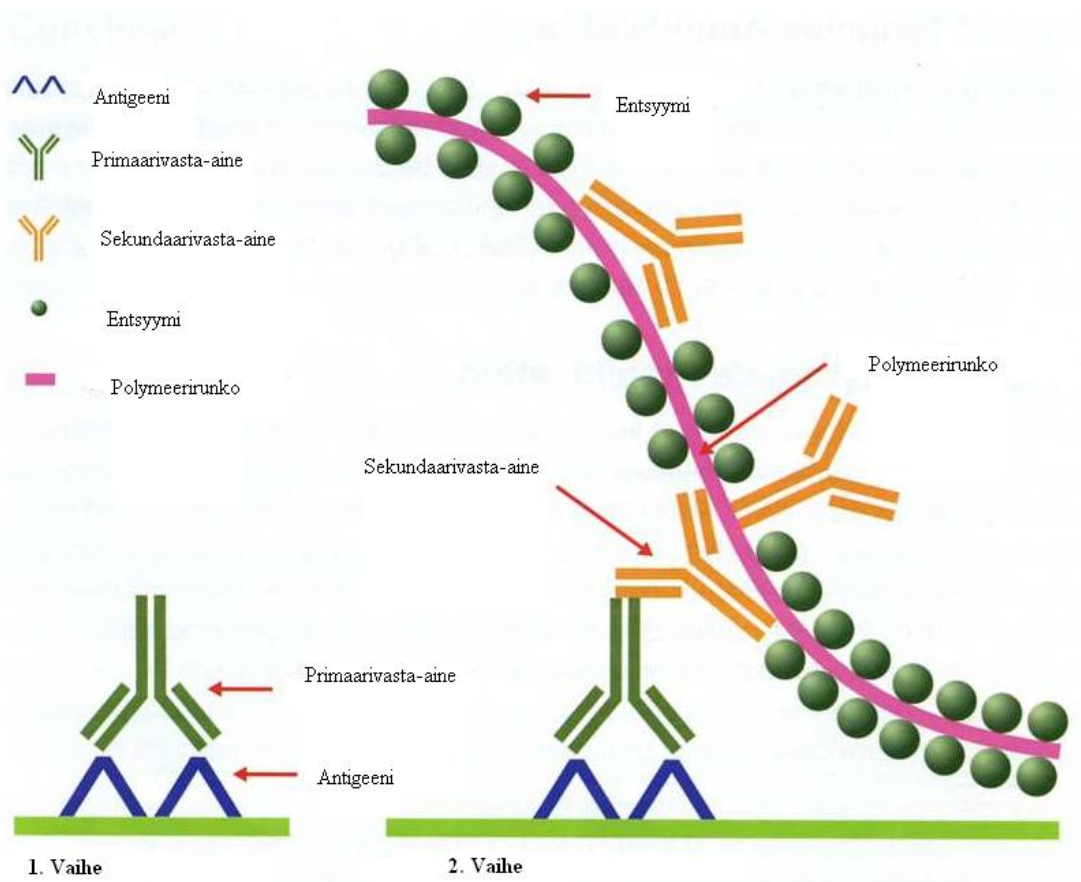
EPOS-menetelmä

Polymeeritekniikkaan perustuvia menetelmiä on kahdenlaisia. Ensimmäinen näistä on Enhanced polymer one-step (EPOS), jossa jopa 70 entsyymiä ja kymmenen vasta-ainetta on liitetty polymeerirunkoon. Tämä mahdollistaa koko immunohistokemiallisen värjäysprosessin suorittamisen yhdellä kertaa. Toisaalta tämän menetelmän rajoituksena voidaan pitää sitä, että ainoastaan valmistajan tarjoamia primaarivasta-aineita voidaan käyttää hyväksi. Tämän ongelman voittamiseksi keksittiin Envision™-tekniikka. (Key 2006, 50.)

Envision-menetelmä

Toisin kuin primaarivasta-ainetta hyödyntävässä EPOS-menetelmässä Envision™-menetelmässä käytetään sekundaarivasta-ainetta, joka on spesifinen hiiren ja kanin anti-Ig-vasta-aineille. Kuten kuviossa kolme on havainnollistettu, menetelmässä polymeerirunkoon on liitetty useita entsyymejä. Envision menetelmällä on erittäin laajat käyttömahdollisuudet, koska sen avulla voidaan etsiä hiirestä tai kanista peräisin olevaa, kudokseen sitoutunutta primaarivasta-ainetta. (Key 2006, 50.) Menetelmää voidaan käyttää niin parafiini- kuin jääleikkeidenkin immunohistokemialliseen värjäykseen (Kämmerera, Kappa, Gasselb, Richter, Tankd, Dietla & Rucke 2001, 623). Envision me-

netelmä vaatii konsentraatioltaan huomattavasti suurempia primaarivasta-ainelaimennoksia kuin perinteiset immunohistokemialliset menetelmät (Hayat 2002, 199–200).



KUVIO 3: Envision™ polymeerimenetelmä (Mukaillen Key 2006, 47.)

5 TUTKIMUSTEHTÄVÄT

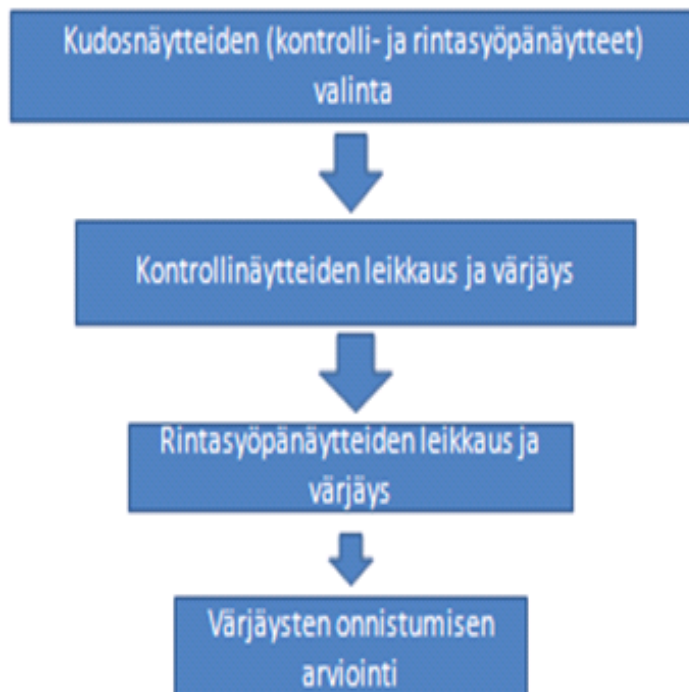
Oulun yliopistollisen sairaalan syöpägenetiikan laboratoriossa on kokeiltu OGG1-korjausentsyymien paikannusta polymeerikitin avulla. Kyseistä tutkimusta jatkettiin patologian laboratoriossa ja meidän osuutemme tässä tutkimuksessa oli kudosleikkeiden leikkaaminen ja immunohistokemiallisten värjäysten suorittaminen polymeeritekniikan avulla. Tutkimustehtävinämme oli värjäysten suorittamisen lisäksi selvittää:

1. optimaalisin vasta-ainelaimennos
2. kudoksen esikäsittely
3. vasta-aineen inkubaatioaika

Tavoitteenamme oli paikantaa OGG1-korjausentsyymi rintasyöpäkudoksista valmistetuista leikkeistä. Nämä tekijät selvittämällä on mahdollista valmistaa edustava kudosleike, josta patologin on mahdollista arvioida mikroskooppisesti potilaan diagnoosia ja ennustetta. Optimaaliset tekijät pyrimme löytämään useilla kokeilukerroilla sekä ottamalla huomioon aikaisemman tutkimustiedon.

6 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

Ennen laboratoriotöiden aloittamista tutkimusryhmä valitsi immunohistokemiallisissa värjäyksissämme käytettävät kudokset (kuvio 4), joista leikattiin sekä kontrolli- että tutkimusnäytteet. Kun kontrollinäytteiden värjäytyminen saatiin onnistumaan halutulla tavalla, aloitettiin varsinaisten tutkimusnäytteiden värjääminen. Jokaisella värjäyskerralla värjättiin noin viisikymmentä kudoleikettä viidestä eri kudoksesta. Jokaisen värjäyskerran jälkeen patologi arvioi värjäysten onnistumisen, minkä perusteella päätettiin onko jatkovärjäyksille tarvetta.



KUVIO 4: Tutkimuksemme eteneminen.

6.1 Novolink™-polymeerikittin periaate työvaiheineen

Työssämme käytettiin Novolink™-polymeerikittä (liite 3), jonka avulla paikansimme OGG1-korjausentyymin. Novolink™:n polymeerin paikantamismenetelmää voidaan immunohistokemiasa käyttää hiiren IgG- ja IgM- sekä kanin IgG-primääri vasta-aineiden paikantamiseen. Endogeeninen peroksidaasiaktiiviteetti neutraloidaan Novocastra™-peroksidaseblock:a apuna käyttäen.

Tämän jälkeen kudosleikkeelle lisättiin Novocastra™-proteinblock, joka estää primaarivasta-aineen ja polymeerin epäspesifistä sitoutumista. Seuraavaksi lisättiin primaarivasta-aine, joka on laimennettu optimaalisesti ja leikkeitä inkuboidaan kyseisellä vasta-aineella. Novocastra™-postprimaryblock parantaa seuraavaksi lisättävän polymeerireagenssin läpäisevyyttä. Novolink™-polymeerirunko tunnistaa hiiren ja kanin kudoksissa olevat primaarivasta-aineet. Leikkeet inkuboitiiin kromogeenillä eli 3,3'-diaminobentsidiinitetrahydrokloridilla (DAB). Reaktio peroksidaasin kanssa saa aikaan näkyvän ruskean värin antigeenin kohdalla. Kudosleikkeet värjättiin Novocast-ra™-hematoksyliinillä tumien esiin saamiseksi ja päällystettiin peitinlaseilla. Tulokset tulkittiin valomikroskooppia apuna käyttäen. (Novocastra Laboratories, NovoLink™ Polymerkit 2006.)

OGG1- korjausentsyymien paikannusta on kokeiltu aikaisemmin syöpägenetiikan laboratoriossa vasta-ainelaimennoksilla 1/1200 ja 1/1500 (liite 4), jolloin leikkeisiin saatiin jonkinasteista värjäytymistä. Värjäyksiä päätettiin kokeilla näillä laimennoksilla ja ottaa kokeiluun mukaan yksi vahvempi ja yksi laimeampi laimennos. Esikäsittelyinä kokeiltiin kudosleikkeiden inkubointia 20 minuutin ajan pepsiiniliuoksessa. Toinen esikäsittelyvaihtoehto oli leikkeiden kiehuttaminen mikroaaltouunissa sitraattipuskurissa kymmenen minuutin ajan. Pepsiinikäsittely ja mikrotus sitraattipuskurissa ovat yleisimmät immunohistokemiallisten värjäysten esikäsittelyvaihtoehdot (liite 5).

Ensimmäisellä värjäyskerralla testattiin puolen tunnin inkubaatioaikaa, sillä immunohistokemian värjäysautomaatit käyttävät tätä aikaa. Puolen tunnin inkubaatioaikaa testattiin vielä toisen kerran laimennokselle 1/500, mutta tämän jälkeen otettiin inkubaatioajaksi 24 tuntia. Pepsiinillä inkubointia kokeiltiin ensimmäisellä kerralla, sillä sen ajateltiin nopeuttavan värjäystä niin, että se saataisiin suoritettua yhden päivän aikana. Tämä ei kuitenkaan tuottanut tulosta, joten pepsiinikäsittelyä ei ensimmäisen kerran jälkeen käytetty. (Liite 2)

6.2 Kontrollien käyttö

Värjäyksissä käyttämämme positiivinen kontrollileike on ohutsuolta, jonka valitsimme toisen värjäyskerran tulosten perusteella. Ohutsuoli värjäytyi muihin kontrollileikkeisiin nähden parhaiten. Negatiivinen kontrolli oli myös ohutsuolta, mutta tähän ei lisätty vasta-ainetta.

Värjäyksissä käytetään aina positiivisia ja negatiivisia kontrolleja. Nämä yhdessä takaavat menetelmän luotettavuuden ja moitteettoman laadun. Värjäyksessä tulisi olla mukana ainakin yksi positiivinen kontrollileike, jonka pitäisi olla mieluummin heikosti kuin vahvasti värjäytyvä. Heikosti vär-

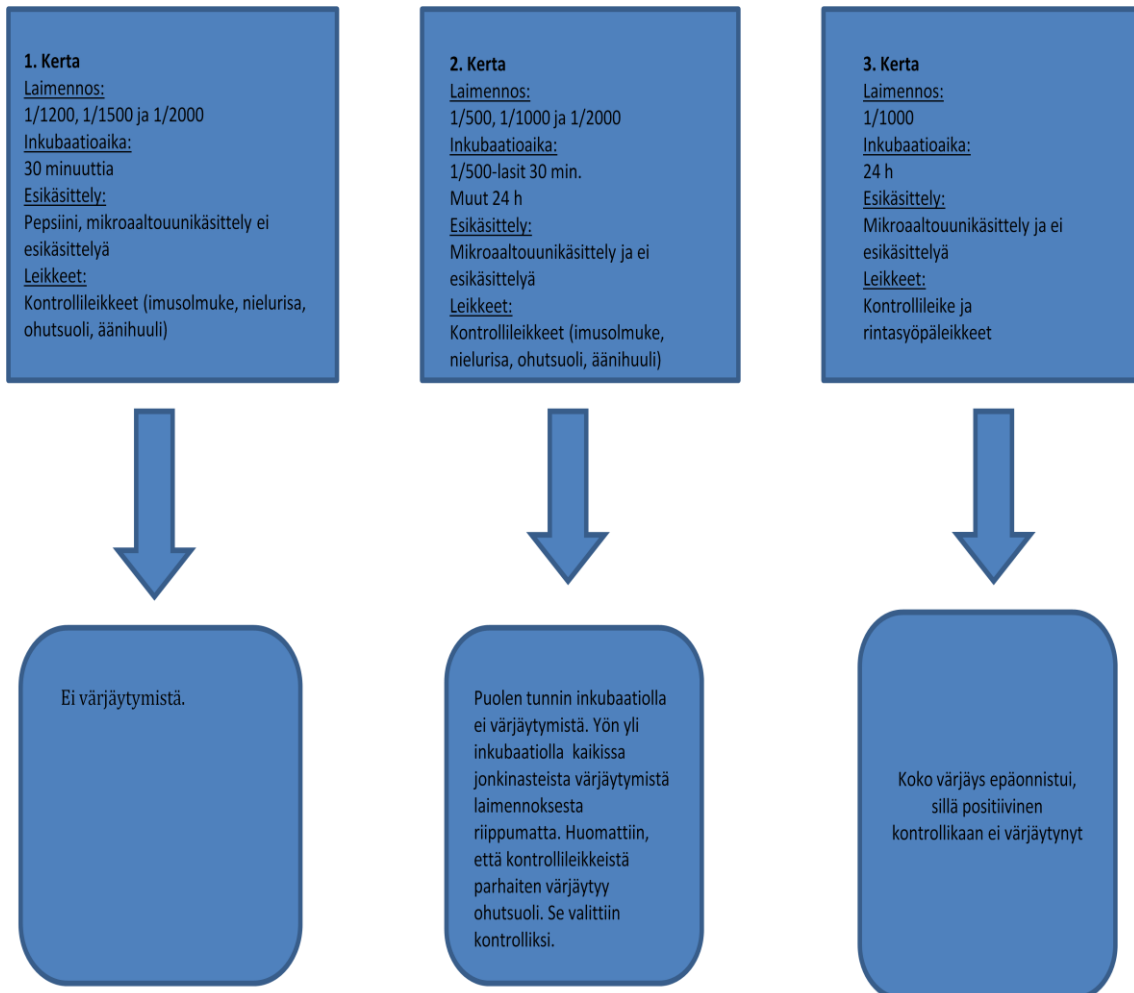
jäytyvä positiivinen kontrollileike auttaa havaitsemaan heikostikin värjäytyneet, mutta silti positiiviset kudisleikkeet. Ellei positiivinen kontrollileike värjäydy odotetulla tavalla, ei varsinaisten leikkeidenkään värjäytymistä voida pitää luotettavana. (Novocastra Laboratories, NovoLink™ Polymerkit 2006.)

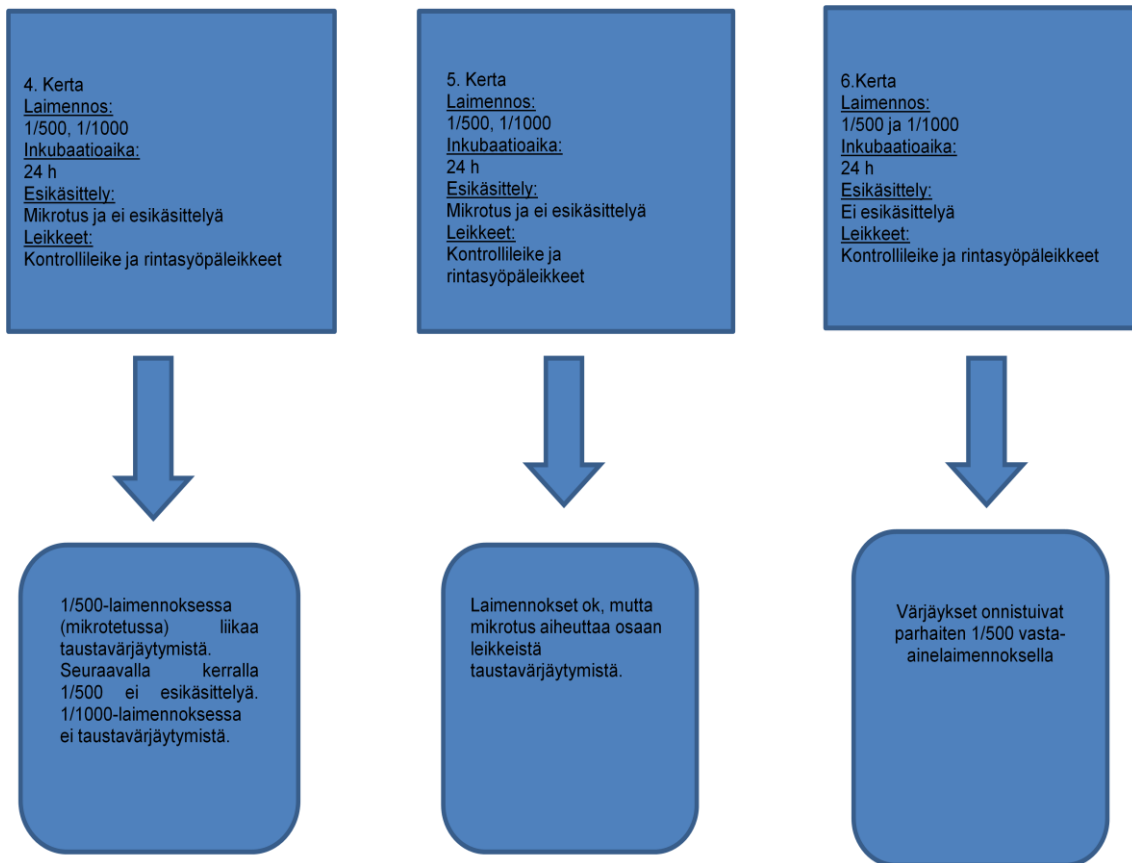
Negatiiviset kontrollileikkeet tulee tarkastaa positiivisten kontrollien jälkeen, jotta vältetään vääriä positiivisilta tuloksilta. Negatiivisten kontrollileikkeiden värjäytyminen havaitaan mikroskoopissa yleensä hajanaisena värjäytymisenä. Hajanainen värjäytyminen voi johtua kudosten liiallisesta formaliiniinnityksestä. Nekroottiset tai degeneroituneet solut värjäytyvät usein epäspesifisesti. Negatiivisen kontrollileikkeen värjäytyminen voi johtua proteiinien ei-immunologisesta sitoutumisesta tai substraattireaktion tuotteista. Värjäytyminen voi johtua myös endogeenisistä entsyymeistä, kuten valeperoksidaasista (punasoluissa), endogeenisesta peroksidaasista (sytokromi C:ssä) tai endogeenisesta biotiinista (maksassa, rinnassa, aivoissa ja munuaisissa). Jotta voitaisi erottaa endogeeninen entsyymiaktiivisuus tai entsyymien epäspesifinen sitoutuminen spesifisestä immunoreaktiivisuudesta, tarvitaan kudospnäyte, joka värjätään vain substraattikromogeenilla. Vasta-ainetta ei siksi lisätä näihin leikkeisiin lainkaan. Mikäli negatiivisissa kontrollileikkeissä ilmenee spesifistä värjäytymistä, ei varsinaisten kudisleikkeiden värjäytymistä voida pitää luotettavana. (Novocastra Laboratories, NovoLink™ Polymerkit 2006.)

Varsinaiset potilaskudospnäytteet tutkittiin vasta kontrollileikkeiden tarkastuksen jälkeen. Mikäli värjäytymistä ei havaita, tarkoittaa se sitä, ettei antigeeniä ole pystytty paikantamaan kudoksesta. Negatiivista tulosta ei tule tulkita niin, että antigeeni puuttuu kudoksesta kokonaan. (Novocastra Laboratories, NovoLink™ Polymerkit 2006.)

7 TUTKIMUSTULOKSET

Tutkimustehtävänäme oli selvittää optimaalisin vasta-ainelaimennos, kudosteikkien esikäsittely ja vasta-aineen inkubaatioaika. OGG1-korjausentsyymien paikantaminen polymeerikitillä onnistui osaltamme hyvin ja saimme tulokset kaikkiin tutkimustehtäviimme. Kuten kuvista viisi voi huomata, parhaat värjäystulokset saatiin, kun vasta-ainelaimennos oli 1/500, inkubaatioaika 24 tuntia ja esikäsittelyä ei käytetty. Kun vasta-ainelaimennos oli 1/2000 ja inkubaatioaika 30 minuuttia, ei värjäytymistä ollut havaittavissa (kuvio 7). Mikroaaltouunissa kuumennuksesta päätettiin luopua, sillä se aiheutti leikkeisiin liikaa taustavärjäytymistä (kuvio 8). Samat havainnot tehtiin leikkeiden kudostyyppistä riippumatta.

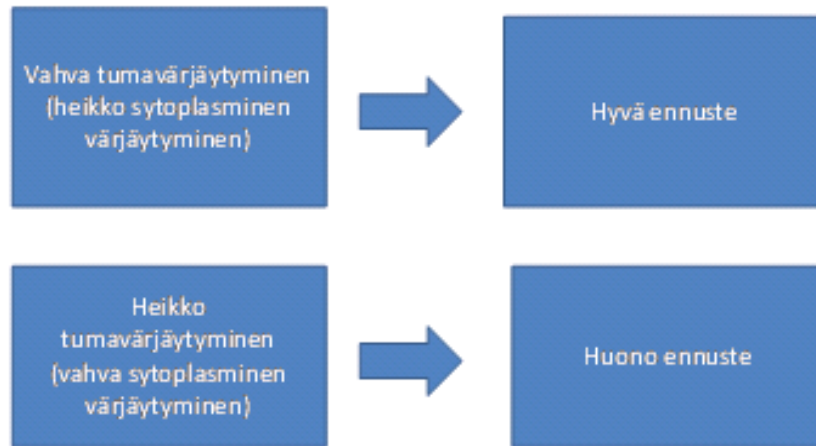




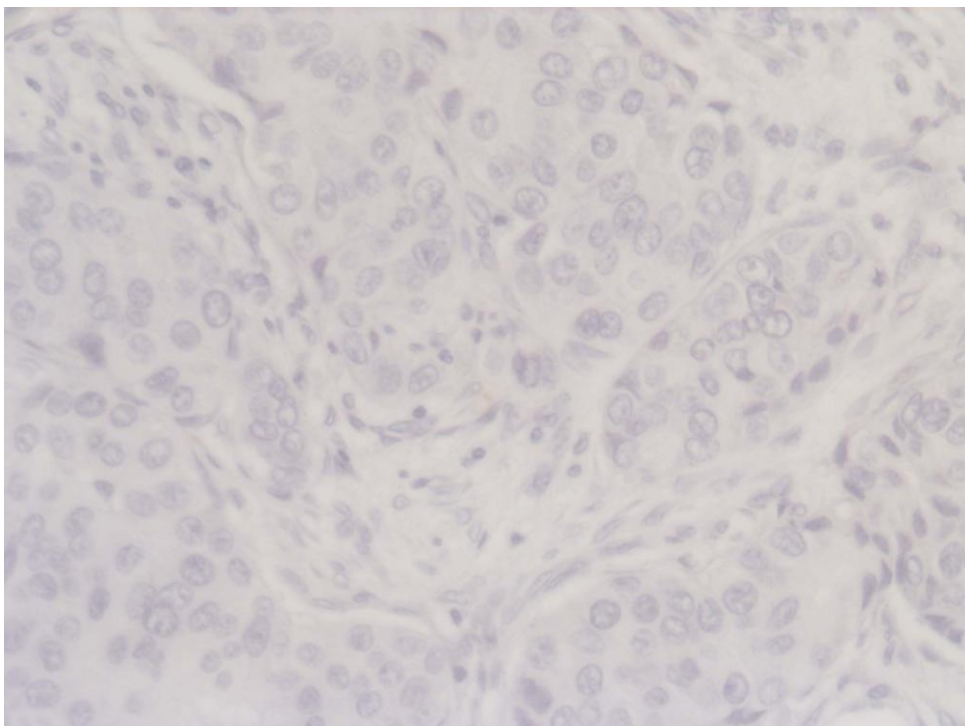
KUVIO 5: Käytännön töiden tulokset.

Tämä tutkimus onnistui niin hyvin, että värjäyksiä aiotaan jatkaa Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laitoksella. Kun värjäystuloksia verrattiin rintasyöpäpotilaiden kliinisiin tietoihin, kävi ilmi, että OGG1-negatiivisuus oli selvästi yhteydessä aggressiivisempiin kasvaimen piirteisiin, kuten huonoon erilaistumiseen ja tiuhaan jakautumiseen. Vaikuttaa siltä, että etenkin tuman OGG1-ekspressio eli -ilmentyminen voi olla yhteydessä parempaan ennusteeseen rintasyöpäpotilailla. Potilaista, joilla OGG1-korjausentsyymi paikannettiin tumaan (kuvio 9), kukaan ei seuranta-aikana kuollut rintasyöpään ja ainoastaan yksi sai uusiutuman. Uusiutuman saaneen potilaan tumavärjäytyminen oli heikkoa. Eli potilaista, joilla tumavärjäytyminen oli heikkoa ja OGG1-korjausentsyymi paikantui sytoplasmaan, kuoli rintasyöpään neljännes ja lähes puolet sai rintasyövän uusiutuman. Kuten kuvio 6 voi huomata, on vahva tumavärjäytyminen yhteydessä hyvään ennusteeseen. Sitä vastoin heikko tumavärjäytyminen viittaa huonoon ennusteeseen. Vahva tumavärjäytyminen tarkoittaa siis sitä, että tumassa on runsaasti OGG1-korjausentsyymiä, joka leikkaa pois 8-OH-G-mutaatioita. Heikko tumavärjäytyminen puolestaan viittaa siihen, että

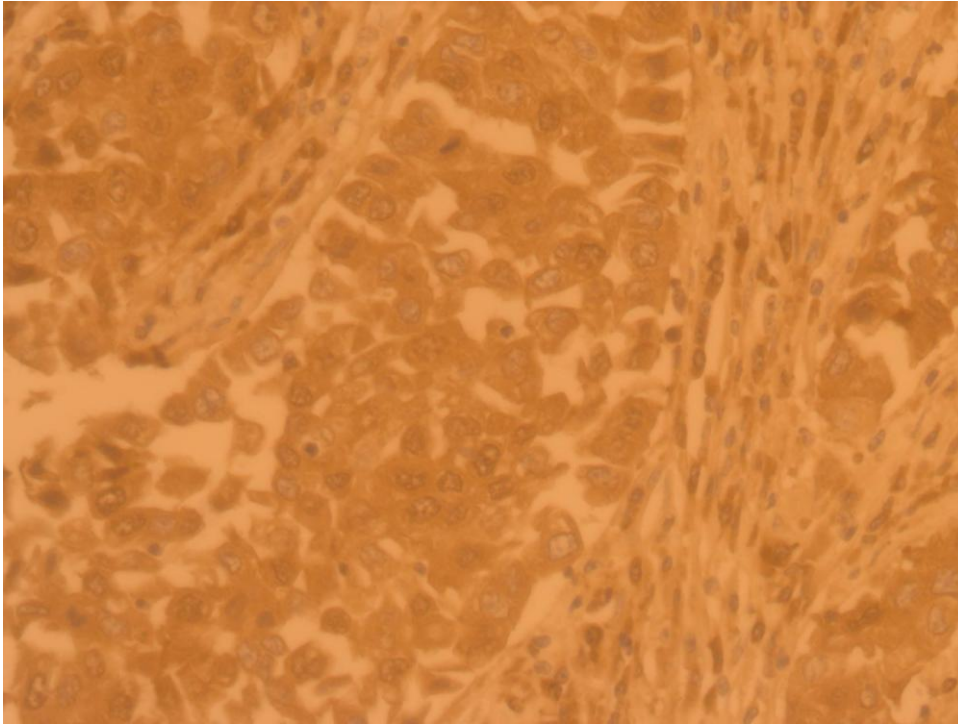
tumassa on vain vähän OGG1-korjausentsyymiä ja näin ollen tumaan pääsee syntymään 8-OH-G-mutaatioita.



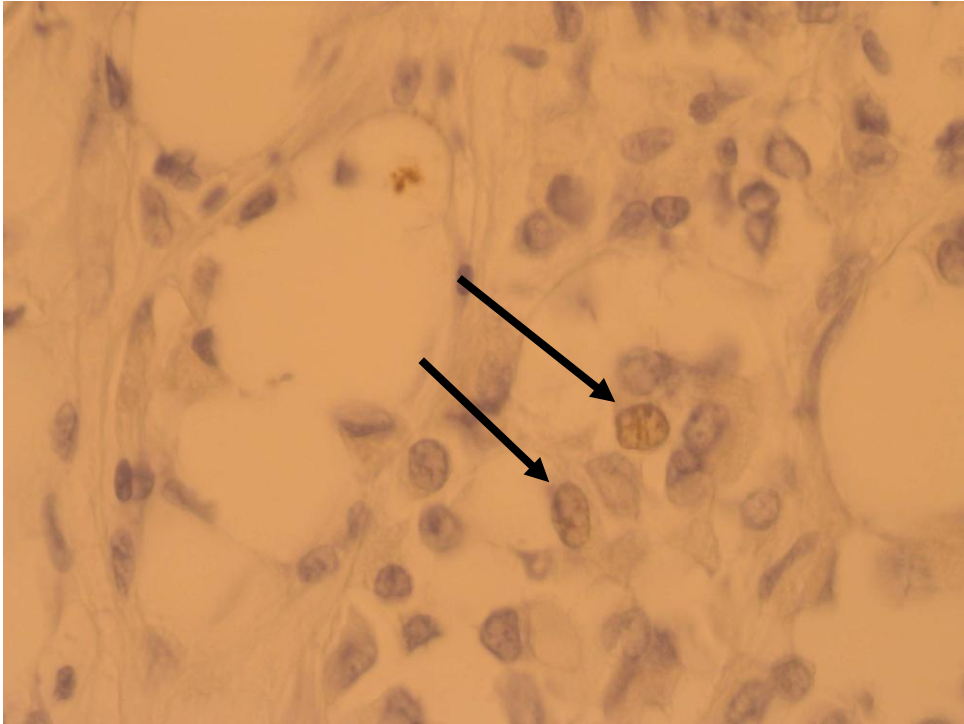
KUVIO 6: Tumavärjätymisen yhteys rintasyöpäpotilaan ennusteeseen.



KUVIO 7: Kudosta, jossa ei OGG1-entsyymiä näkyvissä. Käytetty vasta-ainelaimennos 1/2000, esikäsittely mikroaaltouunikäsittely ja vasta-aineen inkubaatioaika 30 minuuttia.



KUVIO 8. Kudosta, jossa liikaa taustavärijäytymistä. Käytetty vasta-ainelaimennos 1/500, esikäsittely mikroaaltouunikäsittely ja vasta-aineen inkubaatioaika 24 tuntia.



KUVIO 9. OGG1-entsyymi paikannettuna kudoksessa nuolten osoittamissa kohdissa. Käytetty vasta-ainelaimennos 1/500, esikäsitteilyä ei käytetty ja vasta-aineen inkubaatioaika 24 tuntia.

8 POHDINTA

Immunohistokemia on patologisen tutkimuksen voimakkaimmin kasvava erityisala, joten oli hienoa olla mukana tutkimusryhmässä kehittämässä uutta tutkimusmenetelmää rintasyövän tutkimiseen. Tutkimuksemme on tärkeä, sillä nykyään syöpädiagnostiikassa hyödynnetään jatkuvasti enemmän immunologiaan perustuvaa tutkimusta histologisten perusvärjäysten rinnalla. Eri vasta-aineita pystytään paikantamaan koko ajan enenevässä määrin.

Olemme olleet erittäin tyytyväisiä valitsemaamme aiheeseen. Tämän prosessin aikana olemme oppineet paljon histologian ja immunohistokemian tekniikoista ja samalla olemme kehittäneet itsenäistä laboratoriotyöskentelyämme. Olemme myös saaneet lisää oma-aloitteisuutta, ja ongelmanratkaisukykyämme on myös kehittynyt. Immunohistokemiallisten värjäysten suorittaminen oli jatkuvaa oppimista, ja jouduimme arvioimaan kriittisesti omaa työskentelyämme, koska käyttämämme OGG1-korjausentsyymiin paikannusmenetelmä on uusi ja vasta kokeiluasteella. Työn edetessä meidän täytyi miettiä ja kokeilla uusia vasta-ainelaimennoksia, inkubaatioaikoja sekä esikäsittelemahdollisuuksia. Lupaavat tutkimustulokset antavat aiheetta olettaa, että OGG1-korjausentsyymiin paikantaminen polymeeritekniikan avulla voidaan lähitulevaisuudessa ottaa rutiinikäyttöön immunohistokemian laboratoriossa. Oman osuutemme päätyttyä havaitsimme useita jatkotutkimusmahdollisuuksia: värjäyksissä voisi kokeilla esikäsitteilynä inkubointia trypsiiniliuoksella, koska trypsiinikäsitteily voi vaikuttaa eri tavalla kudosten värjäytymiseen kuin nyt käyttämämme pepsiinikäsitteily. Myös 12 tunnin inkubaatioaikaa kannattaisi kokeilla, koska ongelmana oli useasti liiallinen taustavärjäytyminen, joka voi mahdollisesti johtua pitkästä inkubaatioajasta. Aloittamaamme tutkimusta on jo jatkettu Oulun yliopiston patologian laboratoriossa.

Tutkimussuunnitelmassa esittämämme kaavio käytännön töiden suorituksesta muokkautui huomattavasti tutkimuksen edetessä, sillä työtä oli paljon odotettua enemmän. Värjäysten suorittaminen vaati myös enemmän testausta ja kokeiluja, kuin alun perin oli arvioitu. Vaikka tutkimuksen tekeminen oli aikaa vievää, opimme prosessin aikana paljon uutta. Immunohistokemian laboratoriossa värjäykset tehdään yleensä värjäysautomaattien avulla, mutta me suoritimme koko värjäysprosessin käsin. Tämä selkeytti jokaisen työvaiheen teoreettista taustaa.

Tavoitteenamme oli paikantaa OGG1-korjausentsyymi rintasyöpäkudoksista valmistetuista leikkeistä, ja tehtävänäme oli etsiä kudosleikkeille optimaalisin vasta-ainelaimennos, mahdollinen

esikäsitteily ja inkubaatioaika. Pääsimme tavoitteisiimme ja suoritimme tutkimustehtävät suunnitelman mukaan. Tutkimuksemme oli kaiken kaikkiaan onnistunut.

Käsittelimme tutkimusaineistoamme ainoastaan tutkimusnumeroilla, joten tutkimuksessa käytettyjen näytteiden tiedot pysyivät koko prosessin ajan salaisina. Ainoastaan tutkimusaineiston koonnut lääkäri on tietoinen tutkimusaineiston alkuperästä. Mielestämme ei ole epäeettistä käyttää rintasyöpää sairastavien ihmisten kudokset tieteellisessä tutkimuksessa, sillä tutkimustulosten avulla on mahdollista saada uutta tutkimustietoa ja jopa kehittää täsmälääke tämän tyyppiseen rintasyöpään. Tutkimuksemme on luotettava, sillä sen voi toistaa ja saavuttaa samanlaiset tulokset. Tutkimustulokset ovat kaikkien saatavilla ja kaikki työvaiheet tuloksineen on kirjattu tarkoin muistiin. Laboratoriotyöskentelyn laadun varmistimme käyttämällä OGG1-negatiivisia ja -positiivisia kontrollileikkeitä, jokaisella työskentelykerralla.

LÄHTEET

Bancroft J. & Cook H. 1994. Manual of histological techniques and their diagnostic application. Edinburgh: Churchill-Livingstone.

Bancroft J. & Stevens A. 1990. Theory and practice of histological Techniques. Edinburgh: Churchill-Livingstone.

Bettelheim F., Brown W., Campbell M. & Farrell S. 2007. Belmont, Canada: Thomson Brooks/Cole Thomson books.

Bjørheim J. 2005. Oksidativt stress forkorter livet. Tidsskr Nor Lægeforen. Nr. 17, 8. September, 125.

Boenisch T. 2006. Antibodies. Teoksessa Immunohistochemical staining methods. California: Dako, Carpinteria. 1, 5–6.

Boiteux S. and Radicella J. 2000. The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis. Archives of biochemistry and biophysics. vol. 377, No. 1 May 1, 1–8.

Dabbs J. 2002. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone.

Dreher D. & Junod A. F. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. European Journal of Cancer. Volume 32, Issue 1, 30–35.

Hayat M. 2002. Microscopy, immunohistochemistry, and Antigen retrieval methods For light and electron microscopy. New York: Kluwer Academic/ Plenum publishers.

Huovinen P., Meri S., Peltola H., Vaara N., Vaheri A. & Valtonen V. 2007. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Helsinki kustannus Oy: Duodecim.

Karihtala P. & Soini Y. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS – Acta pathologica, microbiologica, et immunologica scandinavica*. Volume 115 Issue 2, 81.

Karihtala P. 2005. Oxidative damage and counteracting mechanisms in breast carcinoma. Oulu: Oulun yliopiston lääketieteellinen tiedekunta.

Kasai H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis Mutation. *Research/Reviews in Mutation Research*. Volume 387, Issue 3, 154–156, 161.

Key M. 2006. Immunohistochemistry. Kirjasta *Immunohistochemical staining methods* California: Dako, Carpinteria. 47, 50.

Kämmerera U., Kappa M., Gasselb A. M., Richterc T., Tankd C., Dietla J., & Rucke P. 2001. A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol. 49, May. 623.

Laiho M. & Latonen L. Hankala häätää, sillä se sotii nuorin voimin. *Tiede* 3/2008. Hakupäivä 26.3.2010. <http://www.tiede.fi/arkisto/artikkeli.php?id=921&vl=2008>

Levine A. J., Finlay C. A. 2004. P53 is a Tumor Suppressor Gene. *Cell*. Vol. S116, January 23. 67–68.

Luna L. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. United states of America: McGraw-Hill inc.

Rantala I. & Laasonen A. 2000. Immunohistokemialliset värjäykset. Helsinki: Labquality Oy.

Naukarinen A. & Von Boguslawsky K. 1998. Immunohistokemia, Teoksessa I. Rantala & K. Lounatmaa (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino, 133–135, 148, 150–151.

Nishimura S. 2002. Involvement of mammalian OGG1(MMH) in excision of the 8-hydroxyguanine residue in DNA. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 32 Issue 9, 813.

Penttilä I. 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Rantala I, Naukkarinen A & Helin H. 1998. Histologia. Teoksessa I. Rantala & K. Lounatmaa (toim.) Biologinen valomikroskopia. Yliopistopaino. Helsinki. 1998, 64–68.

Renshaw, S. 2007. Immunochemical staining techniques. Teoksessa S. Renshaw (toim.) Immunohistochemistry. Great Britain: Scion publishing Ltd, 47.

Saastamoinen S. 2009. Oksidatiivinen stressi ja antioksidantit – kirjallisuuskatsaus terveys- ja laatuvaatimuksista sekä tutkimusmenetelmistä tuotantoeläimillä. Hakupäivä 10.11.2009. <http://helda.helsinki.fi/handle/10138/14419>

Vehmanen L. 2009 Rintasyöpä: toteaminen ja ennuste. Hakupäivä 12.12.2009. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00618

Wu L., Chiu C., Chang P., Wu J. 2003. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. Clinica Chimica Acta. Volume 339, Issues 1–2, January 2004, 1–9.

LIITTEET

LIITE 1: Sanalista

LIITTEET 2–5 poistettu Internet-versiosta

SANALISTA

LIITE 1

antigeeni = molekyyli, joka aiheuttaa elimistössä immuunivasteen

antioksidantti = kemiallinen yhdiste, joka estää toisten yhdisteiden hapettumista

apoptoosi = ohjelmoitu solukuolema

endogeeninen = sisäsyntyinen

entsyymaattinen reaktio = entsyymaattiset reaktiot osallistuvat biologisten prosessien nopeuttamiseen ja säätelyyn

entsyymi = biologinen katalyytti, joka nopeuttaa kemiallista reaktiota

indusoitua = aiheuttaa, aikaan saada

in vitro = koe suoritetaan koeputkessa tai lasimaljoissa

in vivo = elävässä organismissa tehty tutkimus

karsinogeeni = aine, joka altistaa syövälle

korjausentsyymi = solunsisäisiä valkuaisaineita, jotka huolehtivat DNA:n emästen oikeasta järjestyksestä ja kemiallisen rakenteen virheettömyydestä

mikrotomi = mekaaninen leikkauslaite, jolla valmistetaan mikroskoopilla tarkasteltaviksi soveltuvia ohuita leikkeitä kudoksenäytteistä

proteolyttinen entsyymi = valkuaisaineita pilkkova entsyymi

substraatti = yhdiste, jota entsyymi tai muu reaktio muuttaa

taustavärjäytyminen = kudoksenleikkien liiallista värjäytymistä, joka vaikeuttaa näytteen tulkintaa

vapaa happiradikaali = hapen osittain pelkistyneitä yhdisteitä, jotka ovat erittäin reaktiivisia ja voivat aiheuttaa soluvaurioita