



## **IMMUNOHISTOKEMIA KOIRIEN MELANOOMAN DIAGNOSTIIKASSA**

Liisa Venho  
Miia Viheriäkoski

Opinnäytetyö  
Lokakuu 2009  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Pirkanmaan ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma, K06MBIOAN

VENHO, LIISA & VIHARIÄKOSKI, MIIA:  
Immunohistokemia koirien melanooman diagnostiikassa.

Opinnäytetyö 67 s., liitteet 7s.  
Syyskuu 2009

---

Opinnäytetyömme aihe, Immunohistokemia koirien melanooman diagnostiikassa, oli lähtöisin Histola Research Oy:ltä. Immunohistokemiaa ei Suomessa tällä hetkellä käytetä eläinten kasvaindiagnoosiin, joten tarve työlle oli todellinen. Yhdysvalloissa tätä menetelmää käytetään eläinlaboratorioissa laajalti, mitä pystyimme hyödyntämään omassa työssämme. Valitsimme melanooman tutkimuskohteeksi sen yleisyyden ja huonon ennusteen vuoksi.

Opinnäytetyömme on toiminnallinen opinnäytetyö, joka sisältää teoriaa koirien kasvaintaudeista, melanoomasta ja immunohistokemiasta sekä myös kokeellisen osuuden dokumentoinnin. Tehtävämme oli selvittää Yhdysvalloissa koirien kasvaindiagnoosiin käytettävät vasta-aineet. Näiden tietojen pohjalta valitsimme yhteistyössä Histola Research Oy:n kanssa opinnäytetyössämme käsiteltäväksi aiheeksi koirien melanooman diagnostiikan. Kokeellisena osuutena suoritimme pienimuotoisen alustavan vasta-aineiden toimivuuden testauksen. Testasimme 13 yleisesti käytetyn diagnostisen humaanivasta-aineen toimivuutta koiran iho- ja ohutsuolinäytteillä. Testatuista vasta-aineista positiivisen värjäytymisen antoi kahdeksan vasta-ainetta. Kokeellisesta osuudesta saatujen tulosten perusteella Histola Research Oy aloittaa vasta-aineiden varsinaisen koestuksen ja suorittaa tarvittavat sisäänajot päämääränensä diagnostinen vasta-ainepaneeli koirien melanoomalle.

---

Avainsanat: immunohistokemia, koiran melanooma, vasta-ainepaneeli, syöpä

## ABSTRACT

Pirkanmaa University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Technology

VENHO, LIISA & VIHARIÄKOSKI, MIIA:  
Immunohistochemistry in Canine Melanoma Diagnostics

Bachelor's Thesis 67 pages, appendices 7 pages  
September 2009

---

The aim of our bachelor's thesis is to improve canine melanoma diagnostics. We obtained our subject from Histola Research Ltd. It is a prominent contract research organization providing a broad range of research and testing services for pharmaceutical, chemical, bio and cosmetic industries as well as for different research institutes and researchers. Immunohistochemistry is not used in animal cancer diagnostics in Finland, so the need for this study is real. In United States of America immunohistochemistry is used routinely in veterinary diagnostic laboratories. Our study is based on their manners and we have gathered information about antibodies they use. Based on this information, we have created proposal of diagnostic antibody panel to improve canine melanoma diagnostics. We chose melanoma as our research subject because it is common in dogs and usually malignant.

Our bachelor's thesis contains theory about canine cancer, melanoma and immunohistochemistry. This study also includes documentation of our experimental proportion in which we tested 13 human antibodies in canine tissues. As a result eight antibodies gave positive reaction. Grounded on these results, Histola Research Ltd. will continue the testing of antibodies.

---

Keywords: Immunohistochemistry, canine melanoma, antibody panel, cancer

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	6
2 KOIRIEN SYÖPÄTAUDIT .....	8
2.1 Syövän synty .....	8
2.2 Yleistä koirien kasvaimista .....	10
2.2.1 Yleisimmät koirien syöpätaudit.....	11
2.2.2 Oireet .....	12
2.2.3 Hoidot .....	14
2.3 Koira eläinmallina ihmisten syövässä .....	15
3 MELANOOMA.....	16
3.1 Melanooma ihmisellä.....	16
3.1.1 Riskitekijöitä .....	17
3.1.2 Melanoomien luokittelu .....	18
3.1.3 Diagnoosi, hoito ja ennuste.....	18
3.2 Melanooma koiralla .....	19
3.2.1 Riskitekijöitä .....	20
3.2.2 Melanoomien luokittelu .....	20
3.2.3 Diagnoosi.....	22
4 IMMUNOHISTOKEMIA .....	23
4.1 Vasta-aineet immunohistokemiassa .....	24
4.2 Vasta-ainepaneelit.....	26
4.3 Immunohistokemian vaatimukset näytteelle .....	27
4.3.1 Fiksaatio .....	27
4.3.2 Prosessointi .....	29
4.3.3 Leikkeiden valmistaminen .....	29
5 IMMUNOHISTOKEMIAALLISET VÄRJÄYKSET.....	31
5.1 Suora ja epäsuora menetelmä .....	32
5.2 Immunoentsyymimenetelmät.....	33
5.3 EnVision™ -menetelmä.....	34
5.4 Antigeenien paljastaminen .....	35
5.5 Epäspesifisten sitoutumiskohtien blokkaminen .....	36
5.6 Värjäystulokseen vaikuttavat tekijät.....	37
5.6.1 Vasta-aineiden titteri ja laimennokset.....	37

5.6.2 Inkubaatioajat ja -lämpötilat .....	38
5.6.3 Pesut.....	39
5.6.4 Värjäysten kontrollointi.....	40
5.7 Virhelähteet .....	42
5.8 Värjäysten tulkinta .....	43
5.9 Immunohistokemiallisten värjäysten edut.....	44
6 OPINNÄYTETYÖN TEHTÄVÄ, TARKOITUS JA TAVOITTEET .....	46
7 TOIMINNALLINEN OPINNÄYTETYÖ.....	47
8 OPINNÄYTETYÖN SUORITUKSEN KUVAUS.....	48
9 POHDINTA .....	55
LÄHTEET.....	56
LIITTEET .....	61

## 1 JOHDANTO

Opinnäytetyömme aiheena on immunohistokemia koirien melanooman diagnostiikassa. Tarkoituksenamme on selvittää mitä uutta se tarjoaa perinteisten histologisten menetelmien lisänä. Immunohistokemia on antigeenin osoittamista histologisesta näytteestä eli kudoksetästä sille spesifisellä vasta-aineella. Menetelmää käytetään kasvaindiagnoosissa silloin, kun morfologian ja kliinisten tietojen avulla ei voida tehdä tarkkaa diagnoosia kudoksessa olevasta sairaudesta. (Naukkari & von Boguslawsky 1998, 133; Miller 2002, 421.)

Saimme opinnäytetyömme aiheen Histola Research Oy:ltä. Histola Research Oy on terveys-, turvallisuus- ja ympäristöalan palvelulaboratorio, joka tarjoaa tutkimus- ja testauspalveluja muun muassa lääkeliikkeen-, kemian-, bio- ja kosmetiikkateollisuudelle sekä eri tutkimuslaitosten ja tutkijoiden käyttöön. (Histola Research Oy 2007.) Aiheen meille antoi Histola Research Oy:n hallituksen puheenjohtaja, dosentti Immo Rantala, mutta työn varsinaisena ohjaajana toimi solubiologi Teemu Honkanen.

Immunohistokemia on vakiinnuttanut asemansa ihmisten kasvaindiagnoosissa, mutta kliinistä immunohistokemiaa harjoittavia eläinlaboratorioita ei pohjoismaissa, Tanskaa lukuun ottamatta, vielä ole. Histola Research Oy:n tavoitteena on tuoda immunohistokemia Suomeen tarkentamaan kotieläinten kasvaindiagnoosia. Yhdysvalloissa immunohistokemia on rutiinikäytössä myös eläinlaboratorioissa ja olemme työtä tehdessämme tutustuneet siellä käytössä oleviin vasta-aine-paneelisiin. (Rantala 2008.)

Opinnäytetyömme tarkoitus on olla mukana kehittämässä diagnostista vasta-aine-paneelia koirien melanoomadiagnostiikan parantamiseksi. Kohde-eläimeksi valittiin koira, koska niiden määrä Suomessa kasvaa jatkuvasti ja nyky-yhteiskunnassa koirien hyvinvointiin ollaan valmiita panostamaan entistä enemmän. Ihosyövät ovat yleisimpiä koirien syöpätauteja ja valitsimme tutkittavaksi syöväksi melanooman, sillä se on usein pahanlaatuinen ja lähettää etäpesäkkeitä eli metastasoi. Projektin tavoitteena on selvittää jo käytössä olevia diagnostisia vasta-aine-paneeleita ja keskittyä immunohistokemiallisten mene-

telmien tuomiin etuihin koirien melanoomadiagnostiikassa. Tarkoitus on myös luoda ehdotelma diagnostisesta vasta-ainepaneelistä, jota voitaisiin käyttää vastaamaan Suomen eläinlääketieteen tarpeita. (Rantala 2008.) Tehtävänämme tässä projektissa on selvittää Yhdysvalloissa käytössä olevia vasta-ainepaneeleja. Opinnäytetyö sisältää myös kokeellisen osuuden, jossa tehtävänämme on alustava humaanidiagnostiikassa käytettävien vasta-aineiden toimivuuden testaus koiran kudoksissa. Työ sisältää tämän kokeellisen osuuden dokumentoinnin. Histola Research Oy jatkaa vasta-aineiden koestusta ja suorittaa tarvittavat sisäänajot.

Kokeellisen osuuden lisäksi opinnäytetyömme sisältää teoretietoa koirien syöpätaudeista, melanoomasta ja immunohistokemiasta perinteisen histologian täydentäjänä. Koirien syöpätaudeista kertova osuus on kirjoitettu kansantajuisella kielellä, sillä sitä tullaan mahdollisesti käyttämään koirien omistajille suunnatussa koirien kasvaindiagnoosiikkaa käsittelevässä artikkelissa, joka julkaistaan Koiramme –lehdessä.

## 2 KOIRIEN SYÖPÄTAUDIT

Suomessa arvioidaan olevan noin 600 000 koira, joista puhdasrotuisia on noin 450 000. Viimeisten kymmenen vuoden aikana rekisteröityjen koirien määrä on ollut jatkuvasti nousussa. (Suomen Kennelliitto – Finska Kennelklubben ry. 2008.) Nykyisessä hyvinvointiyhteiskunnassamme koirien asema on muuttunut työkoirasta kohti perheenjäsentä. Koiria koulutetaan entistä enemmän maanpuolustuksen, poliisin, vartiointiliikkeiden ja tullin palvelukseen sekä pelastustehtäviin. Tämän lisäksi koiria käytetään myös kuulovammaisten kuulokoirina, näkövammaisten opaskoirina ja liikuntavammaisten apukoirina. Näiden eläinten arvoa ei voida rahassa mitata. (Silvola 1999, 30-31.)

On myös muistettava, että terve lemmikkieläin säästää sekä yhteiskunnan että omistajan varoja. Lemmikkieläimen on kliinisin kokein todettu parantavan omistajansa terveydentilaa muun muassa alentamalla verenpainetta ja purkamalla jännitystiloja. Sairas lemmikkieläin puolestaan saattaa aiheuttaa isännälleen sekä psyykkisiä että fyysisiä ongelmia. (Silvola 1999, 30-31.) Näistä syistä johdun koirien hyvinvointiin ja terveyteen ollaan valmiita panostamaan entistä enemmän. Eläimistä huolehtiminen on osa ympäristöterveydenhuoltoa.

Yleisin kuolinsyy pitkään elävillä eläimillä on syöpä. Koirilla esiintyy syöpää yhtä yleisesti ja monikirjoisesti kuin ihmisillä. Tietyt syövät ovat koirilla merkittävästi yleisempiä kuin ihmisillä, esimerkiksi lymfoomat. Mitä aikaisemmin syöpä diagnosoidaan, sitä paremmat mahdollisuudet eläimellä on parantua. (Davol 2000.)

### 2.1 Syövän synty

Yleisesti kasvaimilla eli neoplasioilla tarkoitetaan solukon tai kudoksen epänormaalia kasvua, joka on pääosin ulkoisista kasvuärsykkeistä riippumatonta ja on isäntäeläimistölle haitallista ja tarkoituksetonta. Kasvainsairaudet jaetaan pahan- ja hyvänlaatuisiin. Hyvänlaatuiset kasvaimet ovat paikallisia ja hidaskasvuisia eivätkä yleensä johda hoitamattominaan kuolemaan. Pahanlaatuiset kasvai-



met kasvavat nopeasti ja leviävät muualle elimistöön kohtalokkain seurauksin. (Suominen & Pyrhönen 2007, 16-17.)

Yksityiskohtaisin tieto syövän syntymekanismista on saatu solu- ja molekyylibiologisten tutkimusten tuloksena löytyneistä yksittäisistä syöpägeneistä ja DNA-vaurioista, joilla on syövän synnyssä tärkeä patogeneettinen merkitys (Joensuu ym. 2007, 17). Valtaosa syövästä syntyy solun geenirakenteessa tapahtuvien mutaatioiden seurauksena. Geenivirheen syntyyn voi myötävaikuttaa ulkoiset tekijät, kuten säteily ja passiivinen tupakointi. Geenirakenteen virheet voivat olla myös perittyjä. (Isola 1999, 12-13; Nikkarinen 2008.)

Syövän syntymekanismeista ja syöpää aiheuttavista tekijöistä on saatu tietoa kliinisillä ja epidemiologisilla havainnoilla, koe-eläinmalleilla, soluviljelmillä sekä molekyylibiologian tutkimuksilla. Syövän syntyapahtumille on useita eri näkökulmia, jotka perustuvat näihin tutkimuslinjoihin. Syöpäsolukon solubiologisiin ominaisuuksiin kuuluu solukon kyky tuottaa itse tarvitsemansa kasvusignaalit. Syöpäsolukko on kyvytöntä reagoimaan solunjakautumista rajoittaville ulkoisille signaaleille ja sillä on kyky välttää ohjelmoitu solukuolema eli apoptoosi. Solunjakautuminen syöpäsolukossa on rajoittamatonta ja kasvain kykenee muodostamaan verisuonia. Syöpäkasvain pystyy tunkeutumaan myös ympäröiviin kudoksiin ja muodostamaan etäpesäkkeitä. (Cullen, Page & Misdorp 2002, 7; Joensuu ym. 2007, 16-17.)

Syöpä todetaan usein vasta kun kasvain on biologisen elinkaarensa loppupuolella. Yhdestä pienestä soluryhmästä alkavan syövän on jakauduttava 25-30 kertaa saavuttaakseen yhden senttimetrin läpimitan, jolloin lopputuloksena on  $10^9$  syöpäsolua. Syöpää aiheuttavat DNA-vauriot eivät kohdistu sattumanvaraisesti genomiin vaan sellaisiin geeneihin, joiden virheellisestä toiminnasta käynnistyy malignistumisprosessi. Näitä geenejä kutsutaan syöpägeneiksi, vaikka ne ovatkin pohjimmiltaan normaaleja solun kasvunsäätelyä ohjaavia geenejä. Syöpägenejä on kahta päätyyppiä, onkogenejä ja kasvunrajoitegenejä. (Cullen ym. 2002, 7; Joensuu ym. 2007, 17,25.)

Proto-onkogeenit ovat solun normaalille toiminnalle välttämättömiä geenejä, joiden tehtävänä on solujen kasvun ja lisääntymisen edistäminen. Ne ovat suu-

rimman osan ajasta inaktiivisia eli toimimattomia. Mutaatio voi aktivoida proto-onkogeeneja, jolloin niistä tulee onkogeenejä eli syöpägenejä. Nämä voivat muodostua ainakin kolmella eri tavalla. Pistemutaatio voi saada aikaan jatkuvasti aktiivisen proteiinituotteen, proto-onkogeenin monistuminen saattaa käynnistää proteiinin ylituotannon ja translokaatio voi siirtää proto-onkogeenin aktiivisemmän promootorin alaisuuteen. (Isola 1999, 19-21; Solunetti 2006.) Kasvunrajoitegeenit rajoittavat solujen hallitsematonta jakautumista ja niillä on näin ollen tärkeä rooli solun normaalissa kasvussa. Jos kasvunrajoitegeeni ei toimi, solut alkavat lisääntyä kontrolloimattomasti. (Cullen ym. 2002, 7.)

## 2.2 Yleistä koirien kasvaimista

Kasvaimia tavataan kaikenikäisillä koirilla suhteellisen yleisesti. Kasvain voidaan luokitella epänormaaliksi kudossmassaksi, joka muodostuu tietyn ruumiinosan solujen uusiutuessa tavallista nopeammin. Kasvaimet jaetaan pahanlaatuisiin eli syöpäkasvaimiin ja hyvänlaatuisiin kasvaimiin, jotka eivät ole syöpäsolukkoa. Pahanlaatuiset kasvaimet leviävät ympäristöönsä verenkierron tai immunestijärjestelmän kautta. Hyvänlaatuiset kasvaimet leviävät pahanlaatuisia hitaammin eivätkä lähetä etäpesäkkeitä. Syöpää esiintyy useammin puhdasrotuisissa, kuin sekarotuisissa koirissa ja se on erilaisten onnettomuuksien jälkeen koirien yleisin kuolinsyy. (Fogle 2004, 130; Cullen ym. 2002, 14.)

Hyvänlaatuisten kasvainten aiheuttajia voivat olla esimerkiksi virustartunta, vaurio tai perinnöllinen taipumus. Kaikkien kasvainten syntymekanismi on kuitenkin aina sama, geenivaurio. Solu voi muuttua syöpäsoluksi solutoiminnalle välttämättömien geenien vaurioitua. Tämä geenivirhe voi olla perinnöllinen ja joillakin koirilla on rodulle ominaiset syöpää aiheuttavat geenit. Taulukossa 1 (s. 11) on esitetty eri koiraroduille ominaisia syöpätyyppejä. Greyhoundin ja rottweilerin lisäksi kaikilla suurikokoisilla koiraroduilla on alttius osteosarkoomille eli luusyöville. (Fogle 2004, 130; Morris Animal Foundation 2009.)

TAULUKKO 1. Eri koiraroduille ominaisia syöpätyyppejä (mukailtuna Morris Animal Foundation 2009)

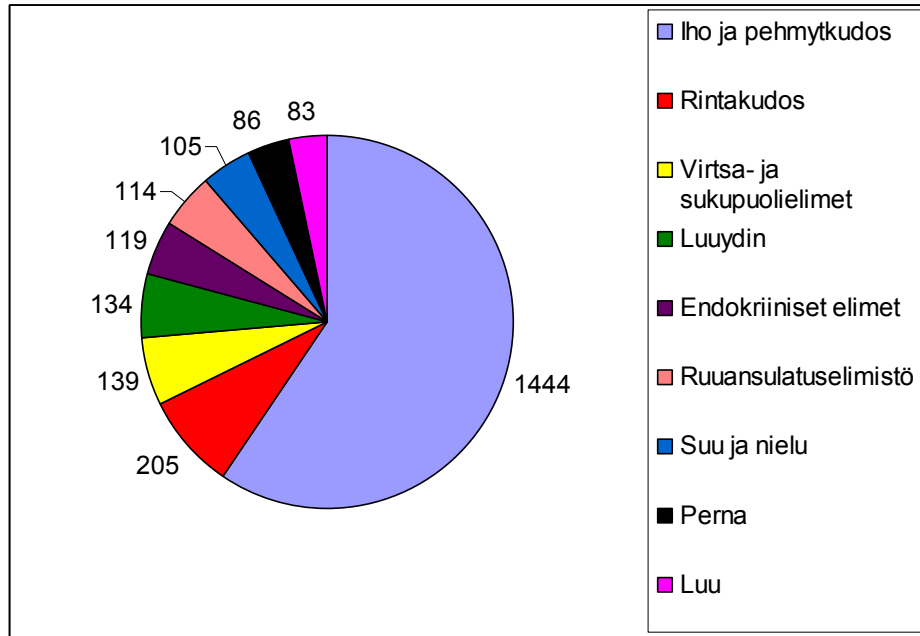
Rotu	Syöpä
Berninpaimenkoira	Histiosarkooma
Bokseri	Lymfooma
Cockerspanieli	Lymfooma
Kultainenoutaja	Lymfooma
Labradorinnoutaja	Lymfooma
Englanninspringerspanieli	Rintasyöpä
Mopsi	Syöttösolusyöpä
Shar Pei	Syöttösolusyöpä
Greyhound	Luusyöpä
Rottweiler	Luusyöpä
Collie	Nenäsyöpä
Skotlanninterrieri	Melanooma (iho ja suu)
Chow chow	Mahasyöpä
Sileäkarvainennoutaja	Melanooma (iho ja suu)

### 2.2.1 Yleisimmät koirien syöpätaudit

Koirien yleisimmät syöpätaudit ovat rinta-, iho-, luu-, sidekudos- ja suusyöpä sekä lymfooma. Kuviossa 1 (s. 12) on esitetty yleisimpien syöpätyyppien jakautuminen koirilla. Syöpien esiintyvyyteen vaikuttavat muun muassa rotu, sukupuoli ja ikä. Yli kymmenenvuotiailla koirilla riski sairastua syöpään on korkea ja kasvaa edelleen iän myötä. (CanineCancer.com. 2008.) Vanhojen koirien syöpäriski kasvaa, koska ajan myötä solut vahingoittuvat ja koirien vastustuskyky syöpiä vastaan heikkenee (Fogle 2004, 136).

Syövän varhainen havaitseminen on usein edellytys taudin parantamiselle, mutta juuri tämä on haastavin osuus syöpädiagnostiikassa. Haastavaa syövän varhaisesta havaitsemisesta tekee kasvainten sijoittuminen niin, etteivät ne ole näkyviä. Pahanlaatuiset kasvaimet aiheuttavat kuitenkin yleensä lopulta oireita,

joiden perusteella kasvain voidaan paikantaa. Iholla tai sen alla olevat kasvaimet on usein helppo havaita. (Davol 2000; Fogle 2004, 132.)



KUVIO 1. Eri syöpätyyppien esiintyminen koirilla (1/100 000 koiraa/vuosi) (muokailtuna Morris & Dobson 2001)

### 2.2.2 Oireet

Koiran hyvinvointia on seurattava tarkasti. Usein koiran omistaja epäilee koiran ulkonäön tai käyttäytymisen perusteella, ettei kaikki ole kunnossa. Esimerkiksi ihosyövät on usein havaittavissa silmin ja näin ollen ne voidaan todeta päivittäisen hoidon tai rutiinitarkastuksen yhteydessä. (Fogle 2004, 132.) Pahanlaatuisen kasvaimen oireita voivat olla epänormaali turvotus, ruoansulatuskanavan verenvuoto tai tukokset, jotka ilmenevät ripulina ja oksenteluna, luotaantyyntävänä hajuna, hengitysvaikeuksina tai pinnistelynä virtsauksen tai ulostuksen yhteydessä. Neurologiset oireet, kuten koordinaation huononeminen ja kouristukset, viittaavat kasvaimen aivoissa tai selkäytimessä. (Davol 2000; Fogle 2004, 132.)

Osa syöivistä ei kuitenkaan aiheuta elinspesifisiä oireita mikä tekee niistä vaikeita havaita. Tällaiset kasvaimet aiheuttavat muutoksia koiran aineenvaihduntaan, josta voi seurata painon laskua, lihasten heikkoutta, uneliaisuutta, ruokahalun menetystä ja karvanlähtöä. Aineenvaihdunnan häiriöitä havaittaessa on syytä välittömästi tutkia mistä oireet johtuvat, sillä taudin edetessä näkyviksi kasvaimiksi, on hoitovaste yleensä heikko ja ennuste huono. (Davol 2000; Eldredge, Carlson, Carlson, Giffin 2007, 546-547.)

Joitakin syöpään vaikuttavia tekijöitä voidaan ehkäistä ennalta tai ainakin hallita. Koiran tasapainotettu ruokavalio tukee vastustuskykyä, etenkin karsinogeenisiä lisäaineita tulee välttää. Koiran kunto on pyrittävä pitämään hyvänä, sillä ylimääräinen rasvakudos edistää esimerkiksi rintasyövän kehittymistä. Vaaleaturkkiset koirat on pidettävä suojassa suoralta auringonvalolta. Vanhojen koirien säännölliset tarkastuskäynnit eläinlääkärillä ovat erityisen tärkeitä. (Fogle 2004, 133; Eldredge ym. 2007, 546.)

Epäiltäessä koiran syöpätautia diagnosointiprosessi käynnistyy eläinlääkärikäynnillä. Eläinlääkäri tutkii koiran aluksi silmämääräisesti ja tunnustellen. Mahdolliset sisäelinten kasvaimet paikallistetaan yleensä röntgenkuvauksen tai ultraäänien avulla. Havaitusta kyhmystä voidaan myös ottaa ohutneulabiopsia, joka tutkitaan sytologisin menetelmin. Eläinlääkäri arvioi kokemukseensa pohjautuen kasvaimen kokoa, sijaintia ja mahdollista diagnoosia. Lääkäri ei kuitenkaan pysty luotettavasti kertomaan onko kyseessä hyvän- vai pahanlaatuinen kasvain. (Fogle 2004, 132; Honkanen 2009.)

Koiran omistajan toiveiden mukaan tutkimuksia jatketaan histologisin menetelmin, jolloin koirasta otetaan kudoksenäyte. Kudoksenäytteet käsitellään erilaisten kudostähtely- ja värjäysprosessien avulla valomikroskoopilla tarkasteltavaan muotoon, jolloin patologi voi antaa niistä lausunnon. Histologinen tulkinta perustuu pitkään kokemukseen siitä, mitä kudokselle eri käsittelyvaiheissa tapahtuu, mikä mahdollistaa normaalin ja poikkeavan rakenteen erottamisen toisistaan. (Rantala, Naukkarinen & Helin 1998, 65.) Histologisten menetelmien avulla patologi pystyy kertomaan onko kasvain hyvän- vai pahanlaatuinen. Immunohistokemia tuo kasvaindiagnostiikkaan lisää tarkkuutta mahdollistaen syöpäsolujen fenotyypin määrittämisen. Sen avulla voidaan myös tehdä tarkempi ennuste

sekä suunnitella hoitoja entistä tarkoituksenmukaisemmin. (Fogle 2004, 132; Honkanen 2009.)

### 2.2.3 Hoidot

Vaikka hyvänlaatuiset kasvaimet ovat yleensä vaarattomia, saattavat ne kasvaessaan aiheuttaa kipua ja häiritä läheisten elinten toimintaa. Jos kasvain ei aiheuta oireita, sitä ei tarvitse hoitaa, mutta sen tilaa on kuitenkin säännöllisesti seurattava. Jos kasvain on pahanlaatuinen, lääkäri laatii omistajan kanssa hoitosuunnitelman, joka perustuu siihen, onko parantuminen mahdollista, vai onko koiran tila pelkästään vakiinnutettava ja ryhdyttävä saattohoitoon. Tarjolla on neljä hoitomuotoa: leikkaus, sädetys, lääkkeisiin perustuva kemoterapia ja immunoterapia. Hoito voi olla myös yhdistelmä näistä hoidoista. Vain eläinlääketieteessä käytetään lisäksi hoitoa, joka perustuu yksinomaan kivun hallintaan tai eutanasiaan. Tällainen päätös voi olla eettisesti vaikea ja omistajalle erittäin raskas. (Bath-Brunswick Veterinary Associates, Inc. 2000; Fogle 2004, 132-133.)

Leikkaus on tehokkain kasvainten hoitomuoto. Sädehoitoa käytetään sellaisiin kasvaimiin, joita ei voida poistaa kokonaan tai leikata lainkaan. Vaarallisuutensa ja kalleutensa vuoksi sädehoitoa käytetään vain harvoin. Kemoterapia tuhoaa nopeasti lisääntyviä soluja ja tehoaa hyvin eräisiin lymfoomamuotoihin etenkin pienillä koirilla. Lääkkeillä on kuitenkin voimakkaita sivuvaikutuksia. Immunoterapialla aktivoidaan immuunijärjestelmä käymään syöpäsolujen kimppuun. Se on vielä varsin vähäisessä käytössä, vaikka sen antamat tulokset esimerkiksi syöttösolusyöpien kohdalla ovat lupaavia. (Cullen ym. 2002, 42; Fogle 2004, 133.) Useat eläinlääkärit ovat sitä mieltä, ettei hoito saa aiheuttaa koiralle kärsimyksiä. Tämän vuoksi kemoterapiaa ja sädehoitoa ei käytetä koirilla yhtä usein kuin ihmisillä. Hoitojen sivuvaikutukset pyritään pitämään mahdollisimman pieninä. Syövän torjuminen koiran elämänlaadun kustannuksella ei aina ole järkevää, vaikka tämä merkitsisikin eliniän pidentymistä. (Fogle 2004, 133; El-dredge ym. 2007, 525.)

### 2.3 Koira eläinmallina ihmisten syövissä

Koirien syöpädiagnostiikalla on suuri rooli ihmisten syöpätutkimuksessa, sillä koirien geneettinen yhteneväisyys ja periytyvien sairauksien kliininen samankaltaisuus tekee koirasta hyvän mallin ihmisten kasvindiagnostiikkaan. (NCBI 2007.) Koirien eläinmallina käytön tavoitteena on tunnistaa tautigeenejä koirien perinnöllisissä sairauksissa ja testata tunnistettuja geenejä vastaavissa ihmispotilasaineistoissa. Koiran käyttö eläinmallina edistää siis sekä ihmisen että koiran terveyttä. Koiralla on ihmisen jälkeen eniten perinnöllisiä sairauksia, ja rodut ovat ainutlaatuisia, suljettuja populaatioita samaan tapaan kuin Suomen väestö. (Heiskanen-Haarala 2007.)

Koira on hyvä eläinmalli, koska puhdasrotuisista koirista on hyvät sukutaulut ja rekisteritiedot. Koiralla sukupolvien väli on vain neljä vuotta ja pentueessa on yleensä 6-10 yksilöä, tästä johtuen sukutauluun saadaan syvyyttä ja leveyttä toisella tavalla kuin ihmisellä. Lisäksi rodun sisällä yksilöt ovat geneettisesti hyvin samankaltaisia mikä tekee tautigeenien paikantamisesta helpompaa. Kun tiedot koirien ja ihmisten syöivistä yhdistetään, päästään paljon parempaan lopputulokseen kuin tutkimalla pelkästään toista. (Heiskanen-Haarala 2007.)

### 3 MELANOOMA

Melanoomat syntyvät melaniinia tuottavista soluista eli melanosyyteistä, jotka sijaitsevat ihon tyvisolukerroksessa (Cangul 2001; Koulu 2003, 264). Suurin osa ihomelanoomista saakin alkunsa ihosta ja noin kolmasosa syntyy jo olemassa olevaan luomeen. Ihokasvaimet ovat hyvin yleisiä. Niitä voi esiintyä kaikilla ja niiden määrä lisääntyy iän kasvaessa. (Suominen & Pyrhönen 2007, 543, 550.)

Ihokasvaimia on runsaasti erilaisia, eikä niitä voi pelkän ulkonäön perusteella tunnistaa. Kasvainten tunnistaminen on kuitenkin tärkeää, jotta välttyttäisiin turhilta hoidoilta, eikä pahanlaatuisten ihokasvainten hoito viivästyisi. Ihosyöpä on yleensä näkyvä, koska kasvain muodostuu ihon uloimmissa kerroksissa. Yleisimmät ihosyövät ovat ei-melanosyyttiset tyvisolusyöpä ja okasolusyöpä sekä melanooma. (Suominen & Pyrhönen 2007, 543.)

#### 3.1 Melanooma ihmisellä

Ihomelanooma on länsimaissa yksi nopeimmin yleistyvistä pahanlaatuisista kasvaimista (Karvonen 2003, 288). Maailman Terveysjärjestön (WHO) arvion mukaan koko maailmassa sairastuu vuosittain 132 000 ihmistä pahanlaatuiseen melanoomaan. Suomessa uusia tapauksia rekisteröidään yli 700 vuodessa. Noin 120 suomalaista kuolee vuosittain melanoomaan. (Tolonen 2007.)

Melanoomaa esiintyy miehillä ja naisilla yhtä usein. Miesten melanoomat esiintyvät useimmiten vartalolla, kun taas naisilla raajojen alueella. (Suominen & Pyrhönen 2007, 543-550.) Muuttuneet auringonottotavat, otsonikerroksen ohememinen ja väestön ikääntyminen selittänevät esiintyvyyden kasvua (Karvonen 2003, 288; Hakulinen 2005, 8; Tolonen 2007).



### 3.1.1 Riskitekijöitä

Melanoomariski ei rajoitu vain luomiin, koska kaikkialla ihossa on melanosyyttjä kattavana verkostona (Snellman 2005, 15). Melanooman vaikutuksesta luomi voi kasvaa, kutistua, tummua tai sen rajat, muoto ja pinta voivat muuttua epä-säännöllisiksi. Luomen ympäristö voi punoittaa ja pahimmassa tapauksessa se voi vuotaa verta. Melanooma lähettää etäpesäkkeitä ensimmäiseksi alueellisiin imusolmukkeisiin. (Suominen & Pyrhönen 2007, 550.)

Auringosta saatava ultraviolettisäteily on tärkein melanooman riskitekijöistä (Suominen & Pyrhönen 2007, 550). UV –säteily jaetaan kolmeen eri aallonpituusalueeseen, lyhytaaltoiseen UVC –säteilyyn, keskipitkäaaltoiseen UVB –säteilyyn ja pitkäaaltoiseen UVA –säteilyyn. UVB –säteily aiheuttaa 80 % auringonvalon haittavaikutuksista. (Snellman 2005, 14.) UVB –säteily yhdistetään ihon palamiseen, kroonisiin ihomuutoksiin ja karsinogeneesiin. Sen vaikutukset kohdistuvat lähinnä orvasketeen, eli ihon pintakerrokseen. UVA –säteily kohdistuu ihon syvempiin kerroksiin. Sen yhteyttä melanoomaan ei ole osoitettu, mutta se mahdollisesti vahvistaa UVB –säteilyn haittoja ja on täten merkityksellinen tekijä melanooman synnyssä. (Snellman 2005, 14; Suominen & Pyrhönen 2007, 544.)

Yksilöllinen ihosyöpäriski saattaa vaihdella yli 1000 -kertaisesti. Auringonvalon lisäksi riskitekijöitä ovat muun muassa runsasluomisuus, epätyypilliset luomet, pisamat, hiusten vaalea tai punertava väri, herkästi palava ihotyyppi tai lähisukulaisella todettu melanooma. (Snellman 2005, 16.) Perinnöllisyys on kuitenkin erittäin harvinaista. Melanoomia voidaan ehkäistä liiallista auringonvaloa välttämällä, ihoa suojaamalla ja yleisellä varovaisuudella. Suojaaminen ei ainoastaan vähennä syövän vaaraa, vaan se myös pienentää sen uusiutumisen riskiä. (Suominen & Pyrhönen 2007, 544.)

### 3.1.2 Melanoomien luokittelu

Ihomelanoomat jaetaan kliinisten ominaisuuksien ja histologisin perustein neljään eri tyyppiin. Pinnallisesti leviävä melanooma on näistä yleisin. Tämän tyyppin viimeaikaisen lisääntymisen on katsottu johtuvan kasvaneesta aurin-gonotosta. Tyypillistä on pitkään kestävä pinnallinen kasvu mutta vähitellen tähänkin melanoomatyyppiin ilmaantuu syvyyskasvua. Ihomuutos on tyypillisesti tumma, epäsymmetrinen ja epätarkkarajainen. (Karvonen 2003, 289-290; Suominen & Pyrhönen 2007, 550-551.)

Lentigo maligna –melanoomaa esiintyy tavallisimmin vanhojen ihmisten kasvoilla. Taudin muuttuminen invasiiviseksi voi kestää pitkään ja se metastasoi harvoin. Eri melanoomatyypeistä lentigo malignalla on kaikkein paras ennuste. Raajojen lentigomainen melanooma esiintyy kämmenissä, kynsien alla, jalkapohjissa ja joskus suun limakalvolla. Ulkonäöltään tauti muistuttaa pinnallisesti leviävää melanoomatyyppiä. (Suominen & Pyrhönen 2007, 551.) Nodulaarinen eli kyhmyinen melanooma on vaarallisin melanoomatyyppi, sillä se alkaa nopeasti kasvaa syvyyssuunnassa ja alkaa lähettää etäispesäkkeitä. Tuumori haa-vautuu helposti ja alkaa vuotaa verta. (Karvonen 2003, 290; Suominen & Pyrhönen 2007, 551.)

### 3.1.3 Diagnoosi, hoito ja ennuste

Melanooman diagnoosi perustuu histologiseen tutkimukseen, jota varten ihomuutos on poistettava tai siitä on otettava näyte (Saksela 2005, 46). Pinnallisen melanooman histologisia muutoksia ovat malignit melanosyytit epidermiksen kaikissa kerroksissa yksittäisinä soluina tai saarekkeina. Kasvainsoluissa on vaihtelevasti melaniinipigmenttiä ja kasvainalueella tulehdussoluja. Histologinen diagnoosi on usein selkeä, mutta se voidaan varmistaa ongelmatapauksissa immunohistokemiallisilla tutkimuksilla. (Suominen & Pyrhönen 2007, 552.) Melanooman diagnostiikassa käytettäviä immunohistokemiallisia värjäyksiä ovat esimerkiksi Melan A, S-100 ja HMB-45 (Koulu 2003, 54). Nämä vasta-aineet,

Melan A, S-100 ja HMB-45, ovat melanoomaspesifisiä vasta-aineita (Kustannus Oy Duodecim 2005).

Jos luomi osoittautuu melanoomaksi, se poistetaan. Taudin leviämistä selvitetään vartijaimusolmukkeita tutkimalla. Vartijaimusolmuke on se solmuke, johon imutiet ensimmäiseksi laskevat tautialueelta ja jossa etäpesäkkeiden kehittymisen riski on suurin. Metastaattisen melanooman hoitoon ei ole vakiintunutta hoitokäytäntöä. Levinneen melanooman hoitoon voidaan kirurgisten toimenpiteiden lisäksi käyttää kemoterapiaa, kemoimmunoterapiaa, immunoterapiaa ja sädehoitoa. Uusia hoitomuotoja kehitetään jatkuvasti ja hoitoon sopivia lääkkeitä testataan. (Suominen & Pyrhönen 2007, 554.) Melanoomarokotteita testataan parhaillaan ja toistaiseksi hoito on kokeellista, eikä parasta mahdollista rokotetta vielä tunneta (Vuoristo 2005, 88).

Melanoomaa pidetään perinteisesti vaarallisena tautina. Etäpesäkkeitä lähettävän melanooman ennuste on huono, mutta varhain todettu pinnallinen melanooma paranee lähes aina. (Karvonen 2003, 291.) Ennuste vaihtelee paljon ennustetekijöiden mukaan, tällaisia tekijöitä ovat muun muassa melanooman paksuus, haavautuminen ja metastaasit (Suominen & Pyrhönen 2007, 554).

### 3.2 Melanooma koiralla

Koirien melanooman syntyyn vaikuttavat tekijät eivät ole niin yksiselitteisesti ymmärrettävissä kuin ihmisillä (Gross ym. 2005, 825). Sijainnistaan johtuen ihokasvaimet ovat yleisin koirilla tavattu kasvainmuoto (Fogle 2004, 134). Kolmannes koirien kasvaimista on ihokasvaimia. Ihosyövät voivat olla pinnallisia tai ihonalaisia, hyvänlaatuisia tai pahanlaatuisia. Ihosyövät luokitellaan sen mukaan, mistä solutyypistä ne ovat lähtöisin. (CanineCancer.com 2009.)

Erilaisia ihokasvaimia ovat muun muassa lipoomat, adenoomat ja endotelioomat. Esimerkiksi lipoomat ovat yleensä vaarattomia, hyvänlaatuisia rasvasolukosta lähtöisin olevia kasvaimia. (CanineCancer.com 2009.) Kaikista koirien pahanlaatuisista kasvaimista 4-7 % on melanoomia. Niitä esiintyy yleisimmin

iholla (11 %) ja suuontelossa (56 %). (Cangul 2001; Smith, Goldschmidt & McManus 2002, 653.)

### 3.2.1 Riskitekijöitä

Kasvainten syntymekanismien takana on aina geenivaurio. Se voi olla myös perinnöllinen, jolloin toisilla roduilla riski sairastua syöpään on suurentunut. Esimerkiksi skotlannin terriereillä, snautsereilla, kääpiösnautsereilla, irlanninsettereillä, kultaisillanoutajilla ja dobermanneilla on todettu olevan suurentunut riski sairastua melanoomaan. Tautia tavataan harvoin esimerkiksi siperian huskyilla. Esiintyvyydessä ei ole eroa sukupuolten välillä. (Smith ym. 2002, 653; Goldschmidt & Hendrick 2002, 81; Fogle 2004, 130.)

Myös ympäristötekijät voivat aktivoida syöpäkasvun geneettisestä taipumuksesta huolimatta. Auringonvalo on yksi tällainen ympäristötekijä. Muut ympäristötekijät, kuten ruokavalio ja stressi, vaikuttavat syöpäkasvuun välillisesti. (Fogle 2004, 130.) Elinympäristömme karsinogeenisten kemikaalien vaikutus koirien syöpien syntyyn on suurelta osin tuntematon (Cullen ym. 2002, 15).

### 3.2.2 Melanoomien luokittelu

Melanooma voidaan luokitella usealla eri tavalla. Joissakin yhteyksissä melanoomalla tarkoitetaan sekä hyvän- että pahanlaatuista uudiskasvua. Toisinaan sillä tarkoitetaan vain pahanlaatuista kasvua. Termillä melanosytooma tarkoitetaan puolestaan melanosyyteistä alkunsa saanutta hyvänlaatuista kasvainta. Melanosytoomat ja melanoomat ovat koirilla yleisiä. Amelanosyyttisessä melanoomassa melanosyytit eivät tuota pigmenttiä. Tällainen melanooma on usein aggressiivinen ja sitä on vaikeampi diagnosoida. (Gross, Ihrke, Walder & Affolter 2005, 813; Goldschmidt & Hendrick 2002, 78.)

Melanooma ilmenee usein ruskeina tai mustina noduuleina eli ihonalaisina kyhmyinä millä ihon alueella tahansa sekä huulissa ja suussa. Melanooma voi

olla väriltään myös harmaa, punainen tai jopa tumman sininen, riippuen siitä kuinka paljon melaniinia syntyy. Ihomelanoomat, kynsivallissa esiintyviä lukuun ottamatta, ovat usein hyvänlaatuisia. (Fogle 2004, 136; Gross ym. 2005, 825.) Koirien melanoomista noin 10 % esiintyy iholla. Melanoomat vaihtelevat kooltaan, keskimäärin ne ovat halkaisijaltaan 1-3 cm. (Smith ym. 2002, 658; Golschmidt & Hendrick 2002, 81.)

Kynsivallissa esiintyvää pahanlaatuisista melanoomaa tavataan ainoastaan koirilla. Sen osuus kaikista pahanlaatuisista tautitapauksista on noin 8 %. Kynsivallin melanooma ei välttämättä ole näkyvä, mutta se saattaa ilmetä esimerkiksi ontumisena, kynsivallin tulehduksena, kynnen irtoamisena tai epämuodostumana. Näissä tautitapauksissa melanooma kasvaa hitaasti, mutta se saattaa levitä ja tuhota alla olevaa luuta. Jos melanooma diagnosoidaan varhaisessa vaiheessa ennen luuhun leviämistä, päästään varpaan amputaatiolla usein hyvään lopputulokseen. (Golschmidt & Hendrick 2002, 83; Fogle 2004, 136.)

Suurin osa koirien pahanlaatuisista melanoomista esiintyy suuontelossa ja huulissa (Golschmidt & Hendrick 2002, 81). Myös silmässä esiintyvä melanooma on yleensä pahanlaatuinen. Suuontelon melanooma kasvaa nopeasti, on invasiivinen ja uusiutuu usein leikkauksen jälkeen. (Smith ym. 2002, 653.) Ne ovat yleisiä yli 10 -vuotiailla koirilla. Pienillä roduilla, erityisesti cockerspanieleilla ja roduilla, joilla suun limakalvo on tumma, on suuri riski sairastua suuontelon melanoomaan. Kasvain voi sijaita missä tahansa suuontelossa, mutta yleisimmin se esiintyy ikenissä. (Ramos-Vara ym. 2000, 597.) Suuontelon melanooman oireita ovat nielemisvaikeudet, pahanhajuinen hengitys, syljenerityksen lisääntyminen, verenvuoto ja joskus myös alaleukaluun murtumat. Näistä melanoomista 70-90 % lähettää etäpesäkkeitä muun muassa keuhkoihin ja sisäelimiin. (Smith ym. 2002, 653-654.)

### 3.2.3 Diagnoosi

Koirien melanoomien diagnosoinnissa yleisin lähestymistapa on histopatologia ja immunohistokemialliset värjäykset (Cangul 2001). Suomessa immunohistokemiaa ei kuitenkaan käytetä koirien kasvaindiagnoosissa (Rantala 2008). Tällä hetkellä koirien melanooma diagnosoidaan Suomessa perinteisin histologisin värjäysmenetelmin. Käytettävät värjäykset ovat hematoksyliini-eosiini (HE) ja Fontana-Masson. (Naukkarinen 2008, 38-41, 56; Rantala ym. 1998, 76.)

HE –värjäyksessä hematoksyliini värjää tumat sinivioleteiksi ja eosini punasolut ja muut kudusrakenteet punaisen eri sävyillä. Fontana-Masson on hopeavärjäys, jolla osoitetaan melaniini ja sen esiasteet. Nämä värjäytyvät mustiksi. (Naukkarinen 2008, 38-41, 56; Rantala, Naukkarinen & Helin 1998, 76.) Yhdysvalloissa käytetään yleisesti immunohistokemiaa koirien melanooman diagnostiikassa. Immunohistokemiallisissa värjäyksissä on jo vuosia käytetty S100-vasta-ainetta, vaikkei se ole spesifinen melanoomalle. Melan-A –vasta-aineen on havaittu olevan herkkyydeltään ja spesifisyydeltään parempi koirien melanooman diagnosoinnissa. (Cangul 2001.)

## 4 IMMUNOHISTOKEMIA

Immunohistokemia on hyödyllistä tapauksissa, joissa pelkästään morfologian ja kliinisten tietojen avulla ei pystytä tekemään tarkkaa diagnoosia kudoksessa olevasta sairaudesta (Miller 2002, 421). Usein kuitenkin diagnoosi pystytään tekemään tavanomaisten histologisten värjäysten avulla, jolloin immunohistokemiaa käytetään vain diagnoosin varmentamiseen (Renshaw 2007, 2).

Immunohistokemia on antigeenin osoittamista histologisesta näytteestä eli kudოსleikkeestä sille spesifisellä vasta-aineella. Antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisreaktio saadaan mikroskoopissa havaittavaksi erilaisilla merkkiaineilla liittämällä ne vasta-aineeseen suoraan tai käyttämällä erilaisia leimausmenetelmiä. Nykyään immunohistokemiaa käytetään erityisesti kasvaindiagnoosiin, missä kasvaimelle tyypilliset antigeenit auttavat sen tunnistamisessa ja luokittelussa. (Naukkari & von Boguslawsky 1998, 133; Jackson & Blythe 2008, 433.) Maailmalla immunohistokemiaa käytetään eläinlaboratorioissa rutiininomaisesti ja tarvetta tälle menetelmälle olisi myös Suomessa (Honkanen 2009).

### Antigeeni

Antigeeni on molekyyli, joka tunnistetaan kudoksesta spesifisen vasta-aineen eli antibodyn avulla. Vasta-aine sitoutuu antigeenin osaan, jota kutsutaan epitopiksi eli determinantiksi. Immuunivasteen aikaansaavaa antigeeniä kutsutaan immunogeeniksi. (Naukkari & von Boguslawsky 1998, 133; Naukkari 2002, 3.)

Suuret molekyylit, makromolekyylit, kuten proteiinit, polysakkaridit, lipidit ja nukleiinihapot ovat kaikki mahdollisia antigeenejä (Hiltunen ym. 2003, 179). Myös pienimolekyyliset aineet pystyvät aiheuttamaan immuunivasteen liittymällä isompaan kantajamolekyyliin eli hapteniin (Naukkari & von Boguslawsky 1998, 133).

## Vasta-aineet

Immuunijärjestelmän tärkeimpänä tehtävänä on elimistölle vieraiden makromolekyylien pintarakenteiden tunnistaminen. Näitä proteiineja kutsutaan vasta-aineiksi. (Naukkarinen 2002, 3.) Vasta-aineet sitoutuvat antigeeniin tarttumiskohtansa eli paratoopin avulla. Tällainen sidos on tilapäinen. (Seppälä 2005, 624.) Vasta-aineet ovat plasmamolujen tuottamia seerumin proteiineja, joita kutsutaan immunoglobuliineiksi. Immunoglobuliineja on viisi luokkaa: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 134.) Immunohistokemiasa käytettävät vasta-aineet ovat yleensä IgG-luokkaa, mutta myös IgM-luokan vasta-aineita käytetään jonkin verran (Naukkarinen 2002, 4).

IgG-luokan vasta-aine koostuu neljästä polypeptidiketjusta, joista kaksi on keskenään identtisiä H-ketjuja eli raskasketjuja ja kaksi keskenään identtisiä L-ketjuja eli kevytketjuja. Ketjut ovat asettuneena Y-kirjaimen muotoon. Näitä ketjuja yhdistävät disulfididokset eli rikkisillat. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 134; Naukkarinen 2002, 4; Seppälä 2005, 626.)

Vasta-aineen valenssilla tarkoitetaan identtisten antigeenia sitovien kohtien lukumäärää yhdessä molekyylissä. IgG-molekyylissä valenssi on kaksi ja IgM-molekyylissä kymmenen. Vasta-aineen affiniteetti mittaa voimaa, jolla vasta-aine sitoutuu antigeenin epitooppiin. Aviditeetti tarkoittaa voimaa, jolla monivalenttinen vasta-aine sitoutuu moniepitopipiseen antigeeniin. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 134; Jackson & Blythe 2008, 435.)

### 4.1 Vasta-aineet immunohistokemiassa

Primaarivasta-aine on antigeenispesifinen vasta-aine, jossa tapahtuu värjäyksen ensimmäinen inkubaatio. Sekundaarivasta-aine sitoutuu primaarivasta-aineeseen, joten sen täytyy olla muodostunut sen eläimen immunoglobuliinia vastaan, jossa primaarivasta-aine on tehty. (Naukkarinen & von Boguslawsky 2002, 135.) Sekundaarivasta-aine on yhdistävä tai linkkivasta-aine silloin kun se liittyy kaksi vasta-ainetta toisiinsa (Naukkarinen 2002, 5). Multilinkkivasta-aine



on sellainen vasta-aine, joka on muodostettu eri eläinten, esimerkiksi hiiren, rotan, kanin ja marsun, immunoglobuliineja vastaan. Se on käyttökelpoinen erilaisten mono- ja polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa. (Naukkarinen & von Boguslawsky 2002, 135.)

Polyklonaalinen vasta-aine on useiden solukloonien useita antigeeneja tai saman antigeenin eri epitooppeja vastaan tuotettu vasta-aine (Huovinen ym. 2005, 966). Polyklonaalisia vasta-aineita valmistetaan immunisoimalla koe-eläin halutulla puhdistetulla immunogeenilla. Yleisiä immunisaatioissa käytettäviä eläimiä ovat kani, vuohi, sika ja hevonen. Haluttu vasta-aine eristetään eläimen seerumista. Formaliinifiksoidussa ja parafiiniin valetussa näytteessä osa anti-geenisyydestä on menetetty. Tällöin polyklonaaliset vasta-aineet ovat käyttökelpoisia, koska ne tunnistavat useita epitooppeja. Tämän vuoksi ne ovat epäspesifisiä. (Naukkarinen 2002, 5; Jackson & Blythe 2008, 436.)

Monoklonaalisella vasta-aineella tarkoitetaan yhden antigeenin tietylle epitoopille spesifistä vasta-ainetta, joka on yhdestä B-imusolusta peräisin olevan, identtisen solukloonin tuottamaa. Nämä vasta-aineet sitoutuvat erittäin spesifisesti. Monoklonaalisia vasta-aineita valmistetaan hybridomatekniikalla, missä plasmasolu ja neoplastinen myeloomasolu yhdistetään. Plasmasolu eristetään immunisoidun hiiren tai rotan pernasta ja yhdistetään myeloomasoluun. Näistä soluista syntynyt hybridi voi oikeissa olosuhteissa teoreettisesti tuottaa tiettyä vasta-ainekloonaa rajattomasti. (Naukkarinen 2002, 5; Jackson & Blythe 2008, 436.)

Monoklonaalisten vasta-aineiden etu polyklonaalisiin vasta-aineisiin verrattuna on niiden ehdoton spesifisyys tiettyä antigeenia kohtaan. Monoklonaalisten vasta-aineiden joukossa ei ole epäspesifisiä vasta-aineita. Tämän takia värjätyt valmisteet ovat hyvin siistejä. Toisaalta tietyn antigeenin epitoopin tulee olla ainutlaatuinen, koska monoklonaalisen vasta-aineen spesifiteetistä ei ole hyötyä, jos epitooppi on samanlainen kahdella eri antigeenilla. Toinen huono puoli monoklonaalisten vasta-aineiden käytössä on se, että värjäystulos saattaa olla heikko vasta-aineiden sitoutuessa vain yhdenlaisiin antigeeneihin (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 136; Polak & Van Noorden 2003, 8-9).

## 4.2 Vasta-ainepaneelit

Immunohistokemiallinen vasta-ainepaneeli on syöpädiagnostiikassa käytettävä apuväline, joka sisältää tutkittavalle syövälle spesifiset vasta-aineet. Jo yhtä vasta-ainetta käyttämällä on mahdollista tehdä diagnoosi. Useiden vasta-aineiden käyttö kuitenkin tuo diagnostiikkaan herkkyyttä ja tarkkuutta. Eri syöpäsolut ilmentävät niille tyypillisiä antigeenejä, jotka pystytään paikantamaan niille spesifisillä vasta-aineilla. Näin ollen eri syöville pystytään rakentamaan yksilöllinen lista vasta-aineista, joiden avulla syöpäsolujen fenotyyppi pystytään määrittämään. (Honkanen 2009.)

Tarkempaan kasvaindiagnostiikkaan pyritään jatkuvasti kehittämällä uusia vasta-aineita ja klooneja. Eri vasta-ainekloonit tunnistavat antigeenin eri epitoppeja. Ihmisten syöpädiagnostiikassa melanoomaa tutkitaan tällä hetkellä muun muassa seuraavilla vasta-aineilla: S-100 ja Melan A. Näitä humaanivasta-aineita käytetään myös koirien kasvaindiagnostiikassa, sillä vasta viime aikoina on kehitetty koirien syöville spesifisiä vasta-aineita. (Koenig, Wojcieszyn, Weeks & Modiano 2001, 427; Honkanen 2009.) Taulukossa 2 on kuvattu eri syöpätyypeille spesifisiä vasta-aineita, joita käytetään immunohistokemiallisissa värjäyksissä.

TAULUKKO 2. Tyypillisiä immunohistokemiallisia rutiinivärjäyksiä (World Small Animal Veterinary Association 2008)

Kasvaintyyppi	Spesifinen värjäys
Karsinooma	Sytokeratiinit
Sarkooma	Vimentin
Lymfooma	CD3, CD79a
Melanooma	S100, Melan A
Syöttösolusyöpä	Tryptase

### 4.3 Immunohistokemian vaatimukset näytteelle

Immunohistokemiassa tärkeimmät vaiheet laadukkaisiin tuloksiin pyrittäessä, ovat kudoksen käsittelyn ensivaiheet. Nämä alkavat heti, kun kudoksesta tulee näyte (Farmilo & Stead 2006, 29). Kudoksen hajoaminen alkaa välittömästi, kun kudospala irrotetaan sen luonnollisesta ympäristöstä. Hapen puute, lysosomaaliset entsyymit ja mätänemisprosessi ovat uhka antigeenien säilymiselle (Renshaw 2007, 47).

Jotta kudosta voidaan tarkastella valomikroskooppisesti, täytyy siitä valmistaa ohut leike. Edellytyksenä tällaisille mikroskoopin valoa hyvin läpäiseville leikkeille on fiksaatio ja hyvin leikkautuvan tukiaineen imeyttäminen tai jäädytys. (Rantala, Naukkarinen, Helin 1998, 65.) Immunohistokemiassa on tärkeää, ettei kudos pääse kuivumaan irrottamisen jälkeen. Kudos tulee toimittaa mahdollisimman nopeasti kosteana laboratorioon, jonka jälkeen kudoksesta leikataan sopivat palat fiksaatiota ja edelleen prosessointia varten. (Farmilo & Stead 2006, 29.) Prosessoinnin jälkeen leikkeet kiinnitetään objektilasille ja värjätään, jolloin niistä voidaan tarkastella kudoksen rakennetta sekä tutkia sen eri komponentteja ja niiden suhteita toisiinsa. Tulkinta perustuu tietoon siitä, mitä kudokselle eri käsittelyvaiheissa tapahtuu. Tämä mahdollistaa normaalin ja poikkeavan rakenteen erottamisen toisistaan. (Rantala ym. 1998, 65.)

#### 4.3.1 Fiksaatio

Kunnollinen fiksaatio estää kudoksen pilaantumisen, joten aika kudoksen irrottamisesta ja sen laittamisesta fiksatiiviin tulisi olla mahdollisimman lyhyt (Renshaw 2007, 47). Fiksaation tarkoitus on säilyttää tutkittavan kudoksen rakenteen mahdollisimman alkuperäisenä, ettei siitä häviä molekyyliä jatkokäsittelyiden aikana. Fiksaatio suojelee kudosta osmoosin aiheuttamilta vaurioilta, turpoamiselta ja kutistumiselta. (Rantala ym. 1998, 65; Polak & Van Noorden 2003, 13.) Fiksatiiveja on useita ja niiden valintaan vaikuttaa merkittävästi se, mitä kudosten leikkeistä halutaan saada esille. Useat fiksatiiveista on kehitetty parafiinitekniikkaan joka on yleisin käytössä oleva histologian perusmenetelmä.

Parafiinia käytetään tukiaineena näytteen leikkautuvuuden parantamiseksi. (Rantala ym. 1998, 65.)

Fiksaatio aiheuttaa muutoksia proteiinien tertiäärirakenteissa tehden niistä biologisesti inaktiivisia. Proteiinien kemialliset ja antigeeniset ominaisuudet eroavat suuresti alkuperäisistä muodoistaan, jolla on merkitys erityisesti antigeenien ja vasta-aineiden välisissä reaktioissa. (Renshaw 2007, 48.) Fiksaatio siis kiinnittää antigeenit paikalleen, muuttaen samalla epitooppien muotoa ja vaikeuttaa tällä tavalla vasta-aineiden pääsyä niiden luo. Vaatimukset ovatkin siis ristiriidassa keskenään, sillä hyvän fiksatiivin tulisi säilyttää kudismorfologia, antigeenisuus, estää antigeenin siirtyminen ja diffundoituminen pois kudoksesta värjäyksen aikana. Fiksatiivi ei saisi myöskään vaikeuttaa antigeenin ja vasta-aineen välistä reaktiota. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 148.)

Yleisin histologiassa käytetty fiksatiivi on formaldehydi. Se on kaasu, jonka 37-40 % vesiliuosta kutsutaan formaliiniksi. Fiksaatioon käytetään 10 % fosfaattipuskuroitua formaliinia, jossa formaldehydipitoisuus on 4 %. Formaliini tunkeutuu kudoksiin nopeasti, mutta reagoi kudskomponenttien kanssa hitaasti. Juuri tämän hyvän tunkeutuvuutensa vuoksi se on yleisimmin käytetty fiksatiivi histologisilla näytteillä, jotka voivat olla kooltaan suuria. (Rantala ym. 1998, 65-66.) Formaliini fiksoi näytteet muodostamalla ristsidoksia kudoksen aminohappojen kanssa. Tämä saattaa aiheuttaa antigeenien peittymistä ristsidosten alle. Formaliinifiksaation onnistumiselle olennaista on fiksatiivin hyvä neutralisointi fosfaattisuoloilla ja sopivan pituinen fiksaatioaika. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 148-149.)

Optimaalinen fiksaatioaika on olennaisen tärkeä ja se vaihtelee eri antigeeni-vasta-aine -parien välillä. Formaldehydin ihanteellinen fiksaatio-aika on 6-12 tuntia, mutta joskus tarvitaan pidempääkin fiksaatiota. (Farmilo & Stead 2006, 29.) Fiksaatiota voi nopeuttaa mikroaaltokäsittelyllä, mikä monien antigeenien kohdalla parantaa värjäystuloksen intensiteettiä eli voimakkuutta (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 149).

### 4.3.2 Prosessointi

Kun kudosis on hyvin fiksoitunut, seuraavilla kudoksen käsittelyvaiheilla on vain vähäinen vaikutus antigeenien osoittamiseen kudoksessa. Prosessoinnissa fiksaatioaine korvataan parafiinilla, useiden inkubaatioiden, nousevan alkoholisarjan ja ksyleenin jälkeen, jotta kudosisleikkeiden leikkaaminen on helpompaa. Prosessoinnissa on kuitenkin joitain tekijöitä, jotka tulee ottaa huomioon. Kudosisen lämpötila ei prosessoinnin missään vaiheessa saisi nousta yli 60 °C, sillä useimmat proteiinit denaturoituvat jo tässä lämpötilassa (Farmilo & Stead 2006, 32). Parafiini, jonka sulamispiste on alle 56 °C, on kuitenkin liian pehmeä ja tekee leikkeiden leikkaamisen vaikeaksi. Parhaiten immunohistokemiaan soveltuu parafiini, jonka sulamislämpötila on 56–58 °C. Sen leikkausominaisuudet ovat hyvät ja antigeenien on todettu säilyvän hyvin tässä lämpötilassa. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 149.)

Parafiinin imeytyttyä kudokseen, näyte valetaan sulalla parafiinilla täytettävään metallimuottiin. Tässä vaiheessa varmistetaan, että näyte tulee leikattavaksi oikeassa asennossa. Näytteen suurin pinta laitetaan muottiin alaspäin, jolloin siitä tulee leikkauksen aloituspinta. Kuljetuksessa käytetty kudosiskasetti asetetaan kanneksi muotin päälle. Muotti jäähdytetään kylmälevyllä, jolloin parafiini irtoaa blokkina. Kasetti jää kiinni parafiiniin, jolloin se toimii mikrotomin kiinnitystukena. (Rantala ym. 1998, 68; Niskanen, M. 2006, 13.)

### 4.3.3 Leikkeiden valmistaminen

Ehjat, sileät ja tarpeeksi ohuet leikkeet ovat ehdoton edellytys minkä tahansa värjäyksen onnistumiselle (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150). Kudosisleikkeet pitäisi leikata mielellään 3–4 µm:n paksuisiksi, kuitenkin enintään viiden mikrometrin paksuisiksi. Paksuissa kudosisleikkeissä on useita solukerroksia, mikä tekee tulkinnasta erittäin vaikeaa. (Farmilo & Stead 2006, 32.) Laadukkaan näytteen aikaansaamiseksi myös mikrotomin ja sen veitsen kuntoon pitää kiinnittää huomiota (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150).

Immunohistokemialliset värjäykset ovat monivaiheisia ja lasille leikatut leikkeet saattavat helposti irrota pitkien inkubaatioaikojen, perusteellisten pesujen ja esikäsittelyjen vuoksi. Tämän vuoksi tulee käyttää objektilaseja, jotka on päällystetty adhesiivilla eli sideaineella, kuten poly-L-lysiinillä, organosilaanilla tai muulla kaupallisella aineella. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150.) Joissakin kaupallisissa laseissa pinnan positiivinen varaus sitoo itseensä tehokkaasti kudokset pinnan negatiivisesti varautuneita proteiineja (Farmilo & Stead 2006, 32). Valmiiden lasien annetaan kuivua 37 °C:ssa yön yli, jolloin näytteet kiinnittyvät tiukasti lasille (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150). Ennen värjäyksen aloittamista näytteistä poistetaan parafiini ksyleenissä, ja ne rehydroidaan laskevan alkoholisarjan kautta tislattuun veteen (Rantala ym. 1998, 68).

## 5 IMMUNOHISTOKEMIAALLISET VÄRJÄYKSET

Ensimmäiset immunohistokemiaalliset värjäykset teki Coons suoralla immuno-fluoresenssimenetelmällä jo yli 60 vuotta sitten (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 133). Vuonna 1966 Nakane & Pierce kehittivät immunoentsyymimenetelmän, jossa merkkientsyyminä oli piparjuuriperoksidaasi. Nykyään antigeenien osoittaminen kudokseteistä kuuluu rutiinitekniikoihin patologian laboratorioissa ympäri maailmaa ja käytössä on runsaasti erilaisia antigenien osoitusmenetelmiä. (Miller 2002, 422; Mardle 2007, 33).

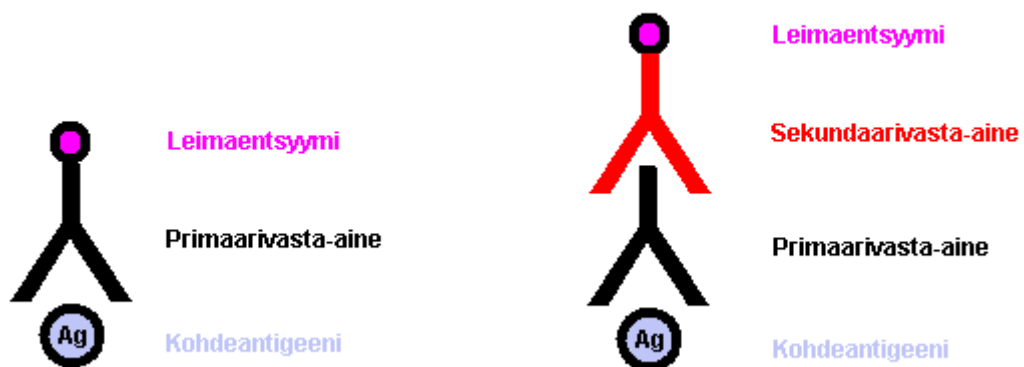
Immunohistokemiaallisten värjäysten avulla näytteestä pystytään osoittamaan esimerkiksi syöpäsolukon jakautumisaktiivisuutta, kasvua edistäviä rakenteita tai jopa syöpään johtavia geneettisiä virheitä (Juhanoja, Aalto, Sallinen & Kainulainen 1998, 233). Immunohistokemiaalliset värjäykset voivat olla yksinkertaisia yhden vaiheen menetelmiä eli suoria menetelmiä tai monimutkaisempia ja aikaa vieviä monen vaiheen menetelmiä eli epäsuoria menetelmiä (Renshaw 2007, 72). Immunohistokemiaallisissa värjäyksissä vasta-aineliuokset annostellaan leikkeiden päälle. Leikkeitä inkuboidaan tietty aika ja huuhdellaan puskurissa, jonka jälkeen siirrytään käytettävän menetelmän mukaiseen seuraavaan inkubaatioon. Värjäyksen viimeisessä vaiheessa vasta-aineen sitoutumiskohta osoitetaan leimaentsyymillä värireaktiolla. Viimeiseksi leikkeet taustavärjätään tumien osoittamiseksi. (Rantala 2002, 19.)

Värjäysmenetelmä on valittava siten, että se on mahdollisimman spesifinen ja sensitiivinen eli herkkä. Spesifisyys tarkoittaa värjäytymisen rajoittumista vain tutkittavaan antigeeniin, siihen vaikuttaa vasta-aineiden laatu sekä käyttöpitoisuus. Näytteen käsittelyvaiheet saattavat myös saada aikaan vasta-aineiden epäspesifisiä sitoutumisia, jolloin spesifisyys vähenee. Herkkyys kuvastaa väärin negatiivisten tulosten puuttumista ja sillä tarkoitetaan merkkiaineen määrää verrattuna näytteen antigeenimäärään. Herkkyttä vähentää antigenisyyden väheneminen. (Rantala 2002, 21; Jackson & Blythe 2008, 453.)

## 5.1 Suora ja epäsuora menetelmä

Suorassa immunohistokemiallisessa värjäysmenetelmässä entsyymillä leimattu primaarivasta-aine reagoi kudoksessa olevan antigeenin kanssa. Vasta-ainetta kutsutaan primaariseksi, kun leima on sidottuna suoraan vasta-aineeseen, joka on sitoutunut antigeeniin (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 144; Mardle 2007, 33; Jackson & Blythe 2008, 436-437). Kromogeenin ja substraatin lisäys saa aikaan näkyvän sakan. Tämä menetelmä on nopea ja spesifinen, mutta lopputulos on kuitenkin usein liian niukka. Inkubointi vain yhdessä leimatussa vasta-aineessa tekee menetelmästä epäherkän, jonka takia sitä ei juurikaan käytetä. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 144; Jackson & Blythe 2008, 438.)

Epäsuoralla menetelmällä voidaan lisätä immunohistokemiallisten värjäysten herkkyyttä (Polak & Van Noorden 2003, 72). Epäsuorassa menetelmässä kudokset inkuboidaan ensin primaarivasta-aineessa. Toisessa vaiheessa lisätään sekundaarivasta-aine johon on liitetty entsyymi. Viimeinen vaihe on entsyymien osoittaminen substraatin ja kromogeenin avulla. Epäsuora menetelmä on suoraa menetelmää herkempi koska primaarivasta-aineeseen sitoutuu useita sekundaarivasta-ainemolekyylejä ja sen myötä myös leimaentsyymiä. Samalla leimatulla sekundaarivasta-aineella voidaan osoittaa useita eri primaarivasta-aineita. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 144.) Kuvassa 1 on esitetty suora ja epäsuora menetelmä.



KUVA 1. Suora ja epäsuora menetelmä (mukailtuna Miller 2002, 428)



## 5.2 Immunoentsyymimenetelmät

Erilaisten leimojen avulla osoitetaan kudoksesta tai soluista vasta-aine, joka on sitoutunut sille spesifiseen antigeeniin. Yleisesti vasta-aineiden leimaamiseen käytetään erilaisia entsyymejä ja fluorokromeja. (Mardle 2007, 33; Jackson & Blythe 2008, 436-437.) Immunoentsyymimenetelmissä käytetään antigeenien paikannukseen merkkiaineena entsyymiä (Rantala 2002, 18; Jackson & Blythe 2008, 436).

Vasta-ainemolekyylien sitoutumiskohdat kudostenleikkeissä osoitetaan entsyymi-substraatti-väriainereaktiolla. Väriaineen eli kromogeenin avulla reaktiopaikalle saadaan värillinen sakka, joka näkyy tavallisella mikroskoopilla. Diagnostiikassa keskeistä on se, että värjäyksiä voidaan tehdä parafiinileikkeistä. Useimmilla entsyymeillä aikaansaatu värjäystulos ei myöskään haalistu. (Rantala 2002, 18; Jackson & Blythe 2008, 436.)

### Piparjuuren peroksidaasi

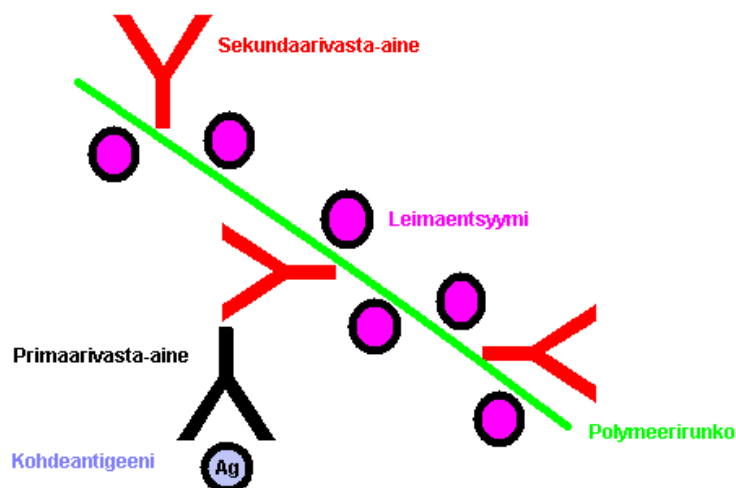
Piparjuuren peroksidaasi on eniten käytetty entsyymileima immunohistokemias-  
sa (Miller 2002, 424). Peroksidaasin aktiivinen osa on hematiini joka sisältää rautaa. Se muodostaa kompleksin vetyperoksidisubstraatin kanssa ja hajoittaa sen vedeksi ja happiatomiksi. Elektronin luovuttaja kromogeeni katalysoi peroksidaasi-vetyperoksidi-reaktiota ja hapettuu värilliseksi lopputuotteeksi. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 138.)

Yleisin peroksidaasi-vetyperoksidi-reaktioissa käytettävä kromogeeni on 3,3' – diaminobentsidiinitetrahydrokloridi (DAB) joka muodostaa lopputuotteena tummanruskean sakan. DAB –väri erottuu selvästi ja on tarkasti ympäristöönsä rajoittuva. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 138; Jackson & Blythe 2008, 436.) DAB luokitellaan mahdolliseksi karsinogeeniksi, joten sen käsittelyssä on noudatettava erityistä varovaisuutta (Mardle 2007, 36).

### 5.3 EnVision™ -menetelmä

EnVision™ -menetelmä perustuu polymeeritekniikkaan. Vasta-aineet ja merkkiensyymit voidaan liittää polymeerirunkoon. Tällaiseen polymeeriketjuun voidaan liittää useita vasta-aine- ja entsyymimolekyylejä herkistämään menetelmää. EnVision™ -menetelmässä dekstraanipolymeeriin on liitetty merkkientensyymi ja sekundaariseerumi. Tämä vastaa epäsuoraa menetelmää, jota dekstraanipolymeeriin liitetyt useat entsyymimolekyylit merkittävästi herkistävät. (Naukkarinen 2002, 35; Key 2006, 50.)

EnVision™ -menetelmä on kaksivaiheinen immunohistokemiallinen värjäysmenetelmä, joka perustuu sekundaarivasta-aineeseen konjugoituun peroksidasaasileimattuun polymeeriin (kuva 2, s. 35). Tämä polymeeri ei sisällä avidiinia eikä biotiinia. EnVision™ -menetelmä on erityisen herkkä, koska polymeeriin voidaan liittää useita peroksidasaasimolekyylejä. Markkinoilla on tarjolla värjäyksen suorittamiseen käytettäviä kittejä, joissa reagenssit ovat valmiita käyttöliuoksia. Reagenssit sisältävät säilöntäaineena myrkyllistä Na-atsidia ( $\text{NaN}_3$ ), joka on hävitettävä runsaan vesimäärän kanssa viemäristä. AEC –kromogeeni on mahdollinen karsinogeeni, joten sitä pitää käsitellä varoen. (Naukkarinen 2002, 57; Key 2006, 50-51.)



KUVA 2. EnVision™-menetelmä (mukailtuna Miller 2002, 429)

## 5.4 Antigeenien paljastaminen

Formaldehydifiksaatio muuttaa kudoksen proteiinimolekyylien muotoa, minkä vuoksi vasta-aineet eivät pysty tunnistamaan niitä. Antigeenien paljastusmenetelmillä voidaan palauttaa proteiinin alkuperäinen rakenne ja rikkoa proteiinien välisiä ristsidoksia. Näin voidaan luoda uudelleen proteiinin tertiäärirakenne tai sitä lähinnä oleva tila. Toisin sanoen antigeenien paljastusmenetelmillä voidaan renaturoida proteiini, jonka rakenne muuttui fiksaation seurauksena. Tämä paljastaa antigeenit ja epitoopit sekä mahdollistaa vasta-aineiden pääsyn epitoopeille. (Renshaw 2007, 48; Jackson & Blythe 2008, 442.)

Antigeenien paljastaminen voidaan tehdä joko lämmittämällä tai entsyymien avulla. Lämmitys voidaan tehdä mikroaaltouunilla, autoklaavilla, painekattilalla, vesihauteella tai kuumalla levyllä. (Renshaw 2007, 60.) Yleisin vaihtoehto formaliinissa fiksoiduille kudoksille on mikroaaltouunilla lämmitys. Lämpökäsittelyn jälkeen useimmat antigeenit ovat havaittavissa, mutta jotkut saattavat tuhoutua ja jotkut pysyä edelleen peitettynä. Tärkeitä tekijöitä paljastettaessa antigeenejä ovat lämpötila, lämpötilan muutokset paljastuksen aikana sekä lämmittämisen kesto. (Hayat 2002, 124.)

Joidenkin antigeenien paljastaminen onnistuu ainoastaan lämmittämisen avulla. Lämmittämisen jälkeen voidaan käyttää vasta-aineita, joita ei voisi käyttää muuten formaliinilla fiksoiduille ja parafiiniin valetuille kudoksille. Lämpökäsiteltujen kudosten solumorfologia säilyy paremmin kuin entsyymikäsiteltujen. Lämmittäminen tehdään yleensä mikroaaltouunissa 10 minuutin ajan 100 °C:ssa. Lasit asetetaan tarjottimelle, jossa on epitoopin paljastusliuosta. Yleisimmin käytössä on sitraattipuskuri, jonka pH on 6. (Hayat 2002, 124–125; Jackson & Blythe 2008, 442.)

Antigeenien paljastaminen voidaan tehdä myös entsyymeillä. Optimaalinen entsyymikäsittely on kokeiltava erikseen jokaiselle antigeenille. Käytännössä esimerkiksi 40 minuuttia 0,5 % pepsiinissä 37°C:ssa sopii useimmille antigeeneille. Myös trypsiiniä käytetään antigeenien paljastamisessa sillä se on voimakas ja hyväksi todettu proteiinien sidoksia hajottava entsyymi. Entsyymikäsittely lisää värjäyksen intensiteettiä merkittävästi, mutta se lisää myös taustavärjäytymistä

ja irrottaa leikettä lasilta. Tuloksena antigeeniä peittävät proteiinidokset avautuvat ja vasta-aineet pystyvät sitoutumaan antigeeneihin. Entsyymikäsittely saattaa tuhota joidenkin antigeenien reaktiivisuuden. Antigeenien paljastamiseen vaikuttaa entsyymikäsittelyn kesto, pH, lämpötila sekä fiksaation kesto. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150; Laasonen 2001, 14-15; Hayat 2002, 117–118,151.)

### 5.5 Epäspesifisten sitoutumiskohtien blokkaminen

Ennen värjäyksen aloittamista eli primaarivasta-aineen lisäystä, mahdolliset epäspesifiset sitoutumiskohdat blokataan pois. Blokkaukseen tehdään seerumilla, joka on tuotettu samassa lajissa kuin primaarivasta-aine. Seerumia laimennetaan puskuriliuoksella ennen käyttämistä. Seerumissa olevat epäspesifiset vasta-aineet sitoutuvat Fc-reseptoreihin ja varauksellisiin tai hydrofobisiin sitoutumiskohtiin. Näin vältetään vääriä positiivisia tuloksia, jotka ilmenevät kun antigeenille spesifiset vasta-aineet sitoutuvat näihin kohtiin. (Polak & Van Noorden 2003, 71.)

Kudoksessa voi esiintyä samankaltaisia entsyymejä kuin käytettävä merkkiaine. Nämä kudoksessa olevat entsyymit saattavat reagoida merkkiainetta etsivän substraatin kanssa. Tämän endogeenisen entsyymin blokkaminen, voi estää vääriä positiivisia tuloksia. (Miller 2002, 435.) Monet solut, etenkin punasolut, sisältävät luonnostaan peroksidaasientsyymiä. Jotta tämä kudoksen endogeeninen peroksidaasi ei reagoisi reaktiossa käytettävän kromogeenin kanssa, sen aktiivisuus tulee poistaa ennen värjäämistä. Vetyperoksidikäsittelyn avulla saadaan peroksidaasi inaktiiviseksi. Myös syanidi ja atsidi inhiboivat peroksidaasia. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 138; Jackson 2007, 224.) Näytteet, jotka sisältävät runsaasti endogeenista alkalista fosfataasia tulee käsitellä ennen värjäystä levamisolilla. Näin alkalinen fosfataasi saadaan inaktivoitua. Alkalinen fosfataasi on imminohistokemiassa käytettävä entsyymi. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 139.)

## 5.6 Värjäystulokseen vaikuttavat tekijät

Immunohistokemialliset värjäykset ovat usein monivaiheisia ja pitkiä. Värjäysohjeiden tarkka ja huolellinen noudattaminen on ehdottoman tärkeää luotettavan ja tarkoituksenmukaisen lopputuloksen saavuttamiseksi. Ammattitaitoisen ja motivoituneen henkilökunnan osuutta onnistuneeseen värjäystulokseen ei pidä aliarvioida.

Immunohistokemiallisten värjäysten laadukkuuteen vaikuttavat oleellisesti titteri eli suurin mahdollinen laimennos, inkubaatioajat ja –lämpötilat sekä pesut. Näitä tekijöitä voidaan muuttaa tarvittaessa, jotta saavutetaan haluttu värjäystulos. Myös kontrollointi on olennaista pyrittäessä laadukkaaseen lopputulokseen. Tavoitteena on saavuttaa spesifinen ja optimaalinen värjäystulos ilman häiriötekijöitä. (Boenisch 2006, 15; Jackson & Blythe 2008, 453.)

### 5.6.1 Vasta-aineiden titteri ja laimennokset

Immunohistokemiassa optimaalinen vasta-aineen titteri määritellään niin, että se on suurin mahdollinen laimennos, jolla saadaan laadukas värjäytyminen ja mahdollisimman pieni taustavärjäytyminen. Titteri on antiseerumia eli vasta-ainetta sisältävää seerumia tai monoklonaalista vasta-ainetta. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 154.) Vasta-aineen affiniteetti eli antigeeni-vasta-ainesidoksen voimakkuus vaikuttaa myös olennaisesti optimaaliseen laimennokseen. Titterin pysyessä vakiona, affiniteetiltaan voimakkaampi vasta-aine todennäköisesti reagoi nopeammin antigeenin kanssa antaen myös voimakkaamman värjäystuloksen samassa ajassa kuin affiniteetiltaan heikompi vasta-aine. (Boenisch 2006, 15.)

Optimaalinen värjäystulos edellyttää oikeaa laimennossuhdetta ja spesifisen primaarisen vasta-aineen käyttöä. Runsaasti antigeenejä sisältävissä kudoksissa väärän laimennossuhteen käyttö lisää väärin negatiivisten tulosten mahdollisuutta. Testaamattomia vasta-aineita käytettäessä tehdään aluksi laaja laimennossarja varmistamaan, ettei vääriä negatiivisia tuloksia ilmene. (Miller

2002, 437.) Vasta-aineet voidaan ostaa valmiiksi laimennettuina, jolloin valmistaja ei yleensä ilmoita pitoisuutta. Laimentamattomasta vasta-aineesta valmistaja ilmoittaa pitoisuuden ja antaa laimennossuosituksen. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 154.)

Yleensä vain primaarisen vasta-aineen laimennokset vaativat hienosäätöä tilanteissa, joissa ilmenee taustavärjäytymistä tai värjäystulos on liian heikko. Sekundaari- ja tertiäärivasta-aineiden laimennokset ovat yleensä samat eri anti-geeneille sen jälkeen kun menetelmä on saatu kunnolla toimimaan. Laimennoksiin vaikuttavat sekä inkubaatioajat että esikäsittelymuodot. Laimennoksissa käytetään puskurissa kantajaproteiinia, joka suojaa vasta-ainetta koeputkeen kiinnittymiseltä sekä polymerisaatiolta. Valmiiksi laimennettuja vasta-aineita pitää säilyttää jääkaapissa, koska ne eivät kestä toistuvaa jäädyttämistä ja sulattamista. Sakkaiset ja sameat vasta-aineet on hävitettävä. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 154–155; Jackson & Blythe 2008, 454.)

### 5.6.2 Inkubaatioajat ja -lämpötilat

Leikkeet eivät saa kuivua missään värjäyksen vaiheessa, jonka vuoksi inkubaatiot tehdään kosteassa kammiossa. Kosteana kammiona voidaan käyttää esimerkiksi petrimaljaa, jonka pohjalla on kostutettua vaahtomuovia tasaisena kerroksena. Vasta-ainekontaminaation välttämiseksi näytelasit laitetaan riittävän välimatkan päähän toisistaan. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 154.) Inkubaation aikana voi tapahtua myös vasta-aineiden haihtumista, mikäli inkubaatiot eivät tapahdu kosteissa olosuhteissa (Miller 2002, 437).

Vasta-aineen titterillä ja inkubaatioajalla on käänteinen suhde toisiinsa pyrittäessä optimaalisiin värjäystuloksiin. Mitä suurempi on vasta-aineen titteri, sitä lyhyempi on inkubaatioaika. Tarkoituksenmukaisempaa on asettaa ensin sopiva inkubaatioaika, jonka pohjalta tehdään sopiva vasta-ainelaimennos. (Boenisch 2006, 17.) Primaarivasta-aineen yleinen inkubaatioaika on yksi tunti huoneenlämmössä. Jos näytteellä ei ole kiire, käytetään kuitenkin pidempää inkubaatioaikaa, laimeaa pitoisuutta sekä jääkaappilämpötilaa. Tämä luo stabiilit olosuhteet antigeeni-vasta-ainereaktiolle ja vähentää taustavärjäytymistä, jolloin välty-

tään vääriltä tulkinnoilta. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 154; Boenisch 2006, 18.) Pitkä inkubaatio sopii hyvin parafiinileikkeille, joiden morfologia kestää sen fiksaation ansiosta (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 154). Antigeeni-vasta-ainereaktio saavuttaa tasapainon 37°C:ssa nopeammin kuin huoneenlämmössä. Jos inkubaatiolämpötilaa nostetaan, täytyy ottaa huomioon vasta-ainelaimennokset. Yli yön tai pidempään kestävässä inkubaatiossa tulee käyttää jääkaappilämpötilaa. (Boenisch 2006, 18.)

### 5.6.3 Pesut

Värjäyksen spesifisyyden varmistamiseksi pestään erittäin huolellisesti pois sitoutumattomat vasta-aineet ennen seuraavan reagenssin lisäämistä (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 155). Pesuilla estetään antigeeni-vasta-aine konjugaattien sakkautuminen lasille. Sakkautuminen vaikeuttaa värjäyksen tulkin-taa ja aiheuttaa taustavärjäytymistä. (Miller 2002, 437.) Pesuissa käytetään isotonista puskuriliuosta, yleisimmin TRIS eli tris(hydroksimetyyli)aminometaani – puskuria tai PBS -puskuria eli fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (phosphate buffered saline). PBS soveltuu useimpiin immunohistokemiallisiin värjäyksiin. TRIS –puskuria käytetään merkkientsyymien ollessa alkalinen fosfataasi, jottei entsyymi hajota puskurin fosfaatteja. Taustavärjäytymisen vähentämiseksi pesu-puskuriin voidaan lisätä normaaliseerumia käytettäessä polyklonaalisia primää-rivasta-aineita. Puskuriliuoksiin voidaan lisätä myös pintajännitystä alentavia aineita, esimerkiksi Triton-X-100, joilla helpotetaan vasta-aineiden tunkeutumista leikkeeseen. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 155.)

Näytelasit pestään kiinnittymättömien reagenssien poistamiseksi varoen leik-keiden irtoamista lasilta. Lasit pestään suihkuttamalla puskuria lasin reunalle, ei suoraan leikkeen päälle. Tämän jälkeen lasit huuhdellaan puskurimaljassa, esimerkiksi 2 x 5 minuuttia. (Naukkarinen 2002, 58.) Pesusta saadaan tehok-kaampi maljaa heiluttelemalla tai magneettisekoittajan käytöllä. Lasi kuivataan pesun jälkeen alapuolelta ja näytteen ympäriltä, jonka jälkeen seuraavan rea-genssin voi lisätä lasille. Värjäysautomaattien värjäystulos on puhdas tehok-kaan pesuvaiheen ansiosta. Käsivärjäystä heikompi intensiteetti on kuitenkin

värjäysautomaattien ongelmana, joten primaarivasta-aineen pitoisuutta on niissä nostettava. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 155.)

#### 5.6.4 Värjäysten kontrollointi

Kontrolleja käytetään varmistamaan immunohistokemiallisten värjäysten spesifisyys ja kontrollointi on tehtävä joka värjäyserän yhteydessä (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 153). Monet tekijät vaikuttavat värjäyksen onnistumiseen. Reagenssi- ja kudokset kontrolloit tulee tehdä, jotta voidaan varmistua siitä, että värjäyksen lopputulos on oikea. (Rasmussen 2006, 113.) Kontrollien avulla on mahdollista tunnistaa reagensseista, kontrollinäytteistä tai värjäyksen suorittajasta johtuvat virhelähteet. Immunohistokemiallisten värjäysten tulokset ovat merkityksettömiä, mikäli tarpeelliset kontrollit ovat jääneet tekemättä. (Jackson 2007, 218.) Uutta vasta-ainetta sisäänajettaessa käytetään usein lisäkontrolleja kartoittamaan vasta-aineen ominaisuuksia (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 153).

Reagenssikontrolleiden käytössä tavoitteena on varmistaa primaari- ja sekundaarivasta-aineiden spesifinen sitoutuminen kohdeantigeeneihinsa. Värjäykseen vaikuttavat tekijät, kuten inkubaatioaika, puskurit ja lämpötila on pidettävä stabiileina. (Jackson 2007, 219.) Tärkein reagenssi immunohistokemiassa on primaarivasta-aine. Ilman primaarivasta-aineen hyvää spesifisyyttä värjäys saattaa epäonnistua. Primaarisille vasta-aineille määritetään ensin niiden optimaaliset laimennossuhteet. Tämän jälkeen niitä testataan kudoksilla, joiden tiedetään olevan joko positiivisia tai negatiivisia vasta-aineelle spesifisen antigeenin suhteen. (Rasmussen 2006, 113.)

Yleisesti kontrolloinneissa tulee osoittaa, että värjäytymistä ei tapahdu, jos primaarivasta-ainetta ei ole käytettävässä kontrolliliuoksessa (Miller 2002, 436). Tällainen kontrollointi on kuitenkin rutiinisti harvoin mahdollista toteuttaa, joten kontrolloinnissa käytetään usein nonimmuuniseerumia tai puskuria primaarin vasta-aineen tilalla. Primaarivasta-aine voidaan myös korvata IgG-fraktiolla joka



sisältää saman määrän proteiinia ja proteiiniaggregaatteja kuin käytetty vasta-aine. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 153.)

Jos testattava vasta-aine on monoklonaalinen, ainoa vaihtoehto sen kontrolloimiseen on käyttää sille isotyypistä eli samaa luokkaa olevaa ja samassa eläimessä valmistettua vasta-ainetta. Isotyypisen vasta-aineen antigeeni on epäspesifinen proteiini, jolloin sen ja kudoksen välisessä reaktiossa tapahtunut värjäys voi johtua vain epäspesifisistä reaktioista sen ja kudoksen välillä tai merkkiaineesta johtuvista tekijöistä. (Jackson 2007, 220.) Kun primaarivasta-aine on kontrolloitu, siirrytään sekundaarivasta-aineen kontrollointiin. Kontrollointi tapahtuu korvaamalla sekundaarivasta-aine nonimmuniseerumilla, joka on samassa eläimessä tuotettua kuin primaarivasta-aine. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 153.)

Kudoskontrollit voivat olla negatiivisia, positiivisia tai sisäisiä kontrolleja (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998,153; Rasmussen 2006, 114). Kaikki kontrollinäytteet tulee käsitellä esikäsittelyineen ja värjäyksineen kuten varsinaiset potilasnäytteet (Jackson 2007, 219). Jos kontrollitulokset eivät ole odotettuja, saatuja värjäystuloksia ei voida pitää luotettavina (Rasmussen 2006, 115).

Positiiviset kontrollit sisältävät tutkittavaa antigeenia. Värjäyksen herkkyyttä voidaan selvittää pitämällä antigeenin määrä vähäisenä. (Rantala 2001, 23.) Värjäysmenetelmän on oltava herkkä pienten antigeenimäärien tunnistamiseen, koska tuumorit ilmentävät antigeenia eri tavoin eri soluissa. Positiivisen kontrollin avulla saadaan varmistettua, että näyte on valmistettu oikein, kaikki tarvittavat reagenssit on lisätty ja että värjäyksessä on käytetty oikeita inkubaatioaikoja ja -lämpötiloja. Sensitiivisyyttä eli herkkyyttä tarkkailtaessa kannattaa valita positiiviseksi kontrolliksi sellainen kudos, joka värjäytyy heikosti positiiviseksi. Optimaalinen positiivinen kontrolli sisältää sekä heikosti että voimakkaasti värjäytyviä osia. (Rasmussen 2006, 114-115.)

Negatiivinen kontrolli ei sisällä lainkaan tutkittavaa antigeenia (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 153). Positiivinen värjäystulos negatiivisessa kontrollissa saattaa johtua vasta-aineen spesifisyyden puutteesta tai epäspesifisestä taustavärjäytymisestä (Rasmussen 2006, 115). Mahdollinen positiivisuus voi

myös johtua väärästä vasta-aineesta tai leimausmenetelmästä (Jackson 2007, 219).

Kudoksessa itsessään on usein tutkittavaa antigeenia normaaleissa kudoksen osissa. Tällainen sisäinen kontrolli on paras kudoksetrolli, koska se on käsitelty samalla tavalla kuin näyte. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 153.) Sisäisellä kontrollilla voidaan periaatteessa korvata positiivinen kudoksetrolli (Rasmussen 2006, 115). Esimerkkinä sisäisestä kontrollista on S100 –proteiini, jota esiintyy melanoomassa ja normaalissa kudoksessa, kuten ääreishermoissa ja melanosyyteissä (Jackson 2007, 221).

## 5.7 Virhelähteet

Immunohistokemiallisen värjäyksen suoritus voi epäonnistua useassa eri vaiheessa. Yleisimpiä virheitä ovat värjäytymisen puuttuminen, heikko spesifi värjäytyminen, taustavärjäytyminen ja kudoksen huono morfologia. Jos värjäytymistä ei tapahdu ollenkaan, voi ongelma löytyä esimerkiksi primaarivasta-ainereagenssista. Reaktiota antigeenin ja primaarivasta-aineen välillä ei tapahdu, jos primaarivasta-aine puuttuu värjäyksestä, sen pitoisuus on liian alhainen, tarvittava esikäsitely on virheellinen tai tekemättä, esikäsitely ei sovi vasta-aineen tunnistavalle epitoopille tai reagenssi on vanhaa. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 156-157; Rantala 2001, 22.) Värjäyksen puuttuminen voi johtua myös merkkientsyymin reaktioista. Värjäyksen onnistuminen ei ole mahdollista jos värjäyksestä on jäänyt substraatti pois tai substraattina käytetty vetyperoksidi on haihtunut pois, kromogeeni on liuennut etanoliin tai ksyleeniin, kromogeenin pitoisuus on liian alhainen tai substraatti-kromogeeniliuos on tehty väärään puskuriin. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 156.)

Heikko spesifi värjäytyminen tarkoittaa, että antigeeni värjäytyy sekä näytteessä että positiivisessa kontrollissa spesifisesti, mutta värjäytyminen on heikkoa. Todennäköinen syy tähän löytyy primaarivasta-aineesta. Ongelmana voi olla primaarivasta-aineen liian alhainen pitoisuus, entsyymikäsitelyn kesto, esikäsitelyn sopimattomuus antigeenille tai vanhentunut vasta-ainereagenssi. Syynä

vaaleampaan värjäntymiseen voi olla myös epätarkkuudet substraatti-kromogeeniliuoksen valmistuksessa tai liian lyhyt inkubaatioaika tässä liuoksessa. Mikäli heikon värjäystuloksen syy ei löydy primaarivasta-aineesta eikä substraatti-kromogeeniliuoksesta, tulee värjäyksen jokainen vaihe tarkastaa järjestelmällisesti. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 156; Hladik & White 2008, 482.)

Yleinen ongelma immunohistokemiallisissa värjäyksissä on taustavärjäytyminen. Lievää taustavärjäytymistä voidaan pitää kauneusvirheenä, mutta jos tausta häiritsee värjäyksen luotettavaa tulkintaa, se on minimoitava. Jos sekä näytteessä että positiivisessa kontrollissa on taustavärjäytymistä, mutta negatiivisessa kontrollissa ei, on syytä haettava primaarivasta-aineesta. Ongelmana voi olla liian suuri primaarivasta-aineen pitoisuus tai epäpuhtaudet, liian voimakas tai pitkäkestoinen entsyymi- tai mikroaaltokäsittely tai immunologisen sitoutumisen puuttuminen. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 157; Rantala 2001, 22.)

Taustavärjäytyminen saattaa johtua myös vasta-aineiden ristireagoinnista. Ongelma ilmenee, kun tutkittava epitooppi on eri proteiinien kesken sama tutkittavassa kudoksessa. Taustavärjäytyminen voidaan estää käyttämällä proteiinia, joka sitoutuu antigeeneihin, ennen primaarivasta-aineen lisäystä tai lisäämisen aikana. (Hayat 2002, 96.) Kudoksen morfologiaan vaikuttaa näytteen fiksaatio, prosessointi, leikkeiden laatu sekä immunohistokemiallinen värjäys. Virheet näissä vaiheissa aiheuttavat kudoksen morfologian huonontumista. Pitkät inkubaatioajat sekä entsyymi- ja mikroaaltokäsittelyt irrottavat leikettä lasilta. Leikkeiden päällä voi olla reagenssien vääristä pitoisuuksista tai puutteellisista pesuista johtuvaa värisakkaa, mikä osaltaan myös huonontaa kudoksen morfologiaa. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 157.)

## 5.8 Värjäysten tulkinta

Tulkittaessa immunohistokemiallisia värjäyksiä, on ensin tutkittava huolellisesti kontrollileikkeet. Negatiivisesta reagenssikontrollista puuttuu antigeenispesifi-

nen primaarivasta-aine, jolloin epäspesifi värjäytyminen näkyy hyvin. Positiivisesta ja sisäisestä kudoksetutunnuksesta nähdään värjäytyksen tekninen onnistuminen. Positiivisesta kudoksetutunnuksesta voidaan arvioida myös värjäytyksen herkkyys. Jos positiivinen kontrolli värjäytyy mutta näyte ei, on näyte todella antigeeninegatiivinen tai se on käsitelty niin, että antigeeniepitoopit ovat tuhoutuneet. Negatiivista tulosta ei voida tämän vuoksi pitää varsinaisena lopputuloksena, kuten hyvin kontrolloitua spesifistä positiivista värjäytystä. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 158; Rantala 2001, 23.) Jotta immunohistokemialliset reaktiot voidaan havaita mikroskoopissa, on mukana oltava leima. Lähes kaikki käytettävät leimat vaativat lisävaiheita näkyäkseen lopputuloksessa. Entsyymien täytyy reagoida substraatin ja kromogeenin kanssa, jotta ne muodostavat näkyvän sakan. (Polak & Van Noorden 2003, 45.)

Hyvin onnistuneen värjäytyksen tuntomerkkejä ovat selkeä värin paikantuminen esimerkiksi solun sytoplasmassa ja solu- ja tyvikalvoilla ja riittävä värin intensiteetti. Onnistuneessa värjäytyksessä värin intensiteetti vaihtelee kasvainsoluissa, koska solut ilmentävät antigeenia eri määriä. Optimaalinen lopputulos edellyttää minimaalisen taustavärjäytymisen ja puhtaan negatiivisen reagenssikontrollin. Värjäysten tulkinnassa tulee olla kriittinen. Huonosti säilyneistä leikkeistä on hankala arvioida värjäytyksen onnistumista, puhumattakaan antigeenin paikallistamisesta. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 158–159.) Luotettavaa tietoa saadaan ainoastaan hyvin säilyneestä kudoksesta ja laadukkaista leikkeistä (Hladik & White 2008, 473).

## 5.9 Immunohistokemiallisten värjäysten edut

Histologinen tutkimus on luotettavin ja tärkein patologian alan diagnostinen menetelmä, vaikka immunohistokemialliset menetelmät ovat laajentaneet ja täydentäneet alan tutkimusvalikoimaa. Kasvaindiagnostiikassa immunohistokemiallisilla värjäyksillä on mahdollista päästä tarkempaan diagnoosiin kuin perushistologisilla värjäyksillä. Histologiset värjäykset tehdään kudoksetutunnuksesta, joita ovat erilaisten täyhystysten yhteydessä otetut koepalat, leikkausten yhteydessä poistetut kasvaimet tai muut kudoksetutunnukset kuten esimerkiksi luomet. Immunohistokemi-

alliset värjäykset tehdään samoista näytteistä, kuitenkin noudattaen tiettyjä erityisvaatimuksia. Rutiinihistologiassa tarkastellaan valomikroskoopin avulla kudoksen rakennetta sekä eri komponentteja ja niiden suhteita toisiinsa. (Rantala ym. 1998, 65; Medix Laboratoriot 2008.)

Käytettävä histologinen värjäys valitaan sen perusteella, mitä kudoksesta halutaan tarkastella. Histologinen tulkinta perustuu pitkään kokemukseen siitä, mitä kudokselle eri käsittelyvaiheissa tapahtuu, mikä mahdollistaa normaalin ja poikkeavan rakenteen erottamisen toisistaan. (Rantala ym. 1998, 65.) Esimerkiksi opinnäytetyömme aiheena olevaa melanoomaa tutkitaan rutiinihistologiassa Fontana-Masson –värjäyksellä. Tämä värjäys osoittaa melaniinin ja sen esiasheet tutkittavasta näytteestä. Kasvaimet, kuten myös melanooma, ilmentävät niille tyypillisiä antigeenejä, jotka on mahdollista paikantaa immunohistokemiallisilla värjäyksillä. Immunohistokemiallisissa värjäyksissä käytettävät spesifiset vasta-aineet reagoivat antigeenien kanssa mahdollistaen syövän tarkan tyyppityksen. (Sulaimon, Kitchell & Ehrhart 2002, 162.)

## 6 OPINNÄYTETYÖN TEHTÄVÄ, TARKOITUS JA TAVOITTEET

Opinnäytetyömme tarkoitus on olla mukana kehittämässä koirien kasvaindiagnoosiikkaa parantavia immunohistokemiallisia tutkimusmenetelmiä. Koko tämän projektin tavoitteena on saada markkinoille tätä osa-aluetta tarkentava vasta-aine-paneeli. Tehtävänä on selvittää Yhdysvalloissa jo käytössä olevat vasta-aine-paneelit ja niiden sisältö. Opinnäytetyömme tulee sisältämään myös kokeellisen osuuden, jossa tehtävänä on alustava vasta-aineiden toiminnan testaaminen. Opinnäytetyö sisältää myös tämän kokeellisen osuuden dokumentoinnin. Histola Research Oy jatkaa vasta-aineiden koestusta ja suorittaa tarvittavat sisäajot.

Ensimmäinen tehtävämme on selvittää mitä vasta-aineklooneja ja vasta-aine-paneeleita yleensä käytetään koirien syöpädiagnoosiikassa Yhdysvalloissa. Käytettävät vasta-ainekloonit saadaan selville Yhdysvalloista kotieläindiagnoosiikkaa harjoittavilta laboratorioilta sähköpostikeskusteluiden ja immunohistokemiallisen tietokannan välityksellä. Seuraava vaihe on alustavan teoreettisen vasta-aine-paneelin valmistaminen yleisimpiä syöpiä varten. Tämän pohjustustyön jälkeen valitaan testattavaksi kontrollinäytteet. Tutkimuskohteena olevaksi syöväksi valitaan yleisyytensä vuoksi melanooma. Testattavat kudokset saamme Helsingin eläinlääketieteelliseltä laitokselta. Histola Research Oy:n suorittaman vasta-aineiden testauksen jälkeen paneeli on toivottavasti valmis markkinoille. Osaa kirjallisesta työstämme tullaan myös mahdollisesti käyttämään Koiramme -lehden koiranomistajille suunnatussa immunohistokemiaa käsittelevässä artikkelissa.

## 7 TOIMINNALLINEN OPINNÄYTETYÖ

”Toiminnallisen opinnäytetyön taustalla on toiminnallinen tiedonkäsitelmä.” Tämä tiedonkäsitelmä korostuu erityisesti aloilla, joilla taitaminen, käytännönläheisyys ja sovellettavuus ovat keskeisessä asemassa. (Airaksinen 2003.) Toiminnallinen opinnäytetyö on työelämän kehittämistyö ja sillä on yleensä toimeksiantaja. Työn tarkoituksena on tavoitella käytännön toiminnan kehittämistä, ohjeistamista, järjestämistä tai järjestyttämistä. Sen tulee olla ammatillisesti kiinnostava ja merkittävä kohderyhmälle. (Virtuaaliammattikoulu 2008.)

Opinnäytetyön tekijältä edellytetään tutkivaa ja kehittävää otetta, vaikka tutkimus usein onkin toiminnallisessa opinnäytetyössä lähinnä selvityksen tekemistä. Tutkiva ote näkyy muun muassa teoreettisen lähestymistavan perusteltuna valintana sekä kriittisenä suhtautumisena omaan tekemiseen ja kirjoittamiseen. Ideana on pyrkiä yhdistämään ammatillinen teoreettinen tieto ammatilliseen käytäntöön. (Virtuaaliammattikoulu 2008.) Toiminnallisessa opinnäytetyössä saattaa usein tulla vastaan asioita, joita ei voi toteuttaa suunnitellulla tavalla. Tämän vuoksi tulee pohtia, millaiset tavoitteet jäivät saavuttamatta, jouduttiinko tavoitteita muuttamaan prosessin aikana ja miksi. Huomiota tulee kiinnittää myös siihen, miten oivaltava, innovatiivinen ja ammatillisesti kehittävää lopputulos on. (Airaksinen & Vilkkä 2003, 154-157.)

Opinnäytetyömme on toiminnallinen opinnäytetyö, jonka tuloksena ei varsinaisesti synny erillistä tuotosta, vaan kirjallinen selvitys aiheesta Histola Research Oy:n käyttöön. Kirjallinen työ sisältää teoriaa koirien kasvaintaudeista, melanoomasta ja immunohistokemiasta sekä myös kokeellisen osuuden dokumentoinnin. Kokeellisesta osuudesta saatuja tuloksia tullaan käyttämään hyväksi uuden menetelmän käyttöönotossa kotieläindiagnostiikkaa harjoittavissa laboratorioissa.

## 8 OPINNÄYTETYÖN SUORITUKSEN KUVAUS

### Alustava tiedonhaku

Tapasimme työelämän edustajamme Immo Rantalan ja Teemu Honkasen 8.10.2008 opinnäytetyön sisällön suunnittelun merkeissä. Tämän jälkeen aloitimme opinnäytetyömme tutustumalla immunohistokemiaa paljon harjoittaviin yhdysvaltalaisiin eläinlaboratorioihin internetin välityksellä. Keräsimme näistä 21:n immunohistokemiaa harjoittavan eläinlaboratorion yhteystiedot (liite 1, 61-62) ohjaajallemme Teemu Honkaselle myöhempää yhteydenottoa varten. Teemu Honkanen tiedusteli sähköpostitse näiden laboratorioden käyttämistä vasta-aine-paneeleista. Tästä oli paljon apua, sillä Suomessa ei vielä tehdä immunohistokemiaa eläinnäytteille kun taas Yhdysvalloissa se kuuluu rutiinityöskentelyyn.

Listasimme myös näiden laboratorioden käyttämät yleisimmät koirilla käytettävät vasta-aineet, myös humaanivasta-aineet (liite 2, s. 63). Listaamamme vasta-aineet ovat käytössä vähintään viidessä edellä mainitussa eläinlaboratoriossa. Tiedonhaussa käytimme yhdysvaltalaisista immunohistokemiatietokantaa. Koostamamme vasta-ainelistaa käytettiin apuna valittaessa Suomen tarpeisiin laadittavaan vasta-aine-paneeliin koestettavat vasta-aineet. Kaikki tämä pohjatyö tähtäsi melanoomadiagnostiikkaan soveltuvan vasta-aine-paneelin valmistukseen, joka on Histola Research Oy:n tehtävä. Meidän tehtävänämmä oli valittujen humaanivasta-aineiden alustava toimivuuden testaus koiran kudoksilla.

### Kokeellinen osuus

Opinnäytetyön kokeellisen osuuden tarkoitus oli testata eri humaanivasta-aineiden toimimista koirien kudoksenäytteillä. Vasta-aineiden mahdollinen toimiminen tai toimimattomuus kuvaa ihmisperäisten vasta-aineiden yleistä toimivuutta koiran kudoksissa. Ihmisillä immunohistokemiassa käytettävien vasta-aineiden siirtäminen koirien kasvindiagnostiikan tarkoituksiin vaatii pitkän, huolellisen ja tarkan testausprotokollan.



Olimme 21.4.2009 Tampereen yliopiston Lääketieteen laitoksella suorittamassa opinnäytetyöhömme liittyvää kokeellista osuutta. Saimme heiltä käyttöömmme tilat, välineet ja reagenssit. Erikoislaboratoriomestari Marja-Leena Koskinen ohjasi ja auttoi meitä kokeellisessa osuudessamme. Kokeellinen osuus sisälsi 13 vasta-aineen toimivuuden testausta koiran kudoksilla. Kudokset saimme Helsingin Yliopistollisesta eläinsairaala. Käytimme vasta-aineiden koestuksessa koiran ohutsuolta ja ihoa. Ohutsuoli soveltuu tähän tarkoitukseen erinomaisesti, sillä se sisältää runsaasti uudistuvaa solukkoa. Testattavat vasta-aineet saimme opinnäytetyömme ohjaajalta, Teemu Honkaselta.

Saimme primaarivasta-aineet valmiiksi laimennettuina, joka helpotti työtämme. Ohutsuolta käytimme seuraavien vasta-aineiden toimivuuden testaamiseen: Cytokeratin Pan (CK-Pan), Cytokeratin High (CK-High), Cytokeratin Low (CK-Low), S-100, Vimentin, MIB-1 (KI-67), Kappa ja Lambda. Ihonäytteillä testattavat vasta-aineet olivat Cytokeratin 5/6 (CK 5/6), HMB-45 (Melanosome), Melan A, CD-1A. Tryptasen toimivuus testattiin sekä iholla että ohutsuoella. Taulukossa 3 (s. 50) on esitetty käytettyjen vasta-aineiden tarkemmat tiedot: valmistaja, kataloginumero, kloni ja laimennos. MIB-1 oli jo aiemmissa Histola Research Oy:n suorittamissa värjäyksissä todettu toimivaksi. Sekundaarivasta-aineena käytimme Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse –vasta-ainetta. Sekundaarivasta-aineet oli sidottu peroksidaasilla leimattuun dekstraanipolymeerirunkoon. Ne oli valmistettu vuohessa kanin ja hiiren immunoglobuliineja eli vasta-aineita vastaan.

Kokeellinen osuus käynnistyi tarvittavien liuosten valmistuksella. Värjäyksessä tarvittavia liuoksia olivat puskuriliuos (0,05M TRIS-HCl + Tween 20) sekä anti-geenin paljastusliuos (10mM TRIS-HCl 1mM EDTA) Saimme liuosten valmistusohjeet (liite 3, s. 64) Marja-Leena Koskiselta, joka oli myös leikannut näytteet 4-5 µm paksuisiksi leikkeiksi ja kiinnittänyt ne Superfrost Plus –laseille lämpökaapissa.

TAULUKKO 3. Käytettyjen vasta-aineiden tiedot (Honkanen 2009).

Vasta-aine	Tiedot
Cytokeratin 5/6	Zymed: 18-0267; D5/16 B4; 1:100
Ki-67	Dako: M7240; MIB-1; 1:110
Kappa	Dako: A191; 1:2000
Lambda	Dako: A193; 1:3000
Cytokeratin Low	Neomarkers: Keratin HMW Ab-2; DE-SQ; 1:300
Cytokeratin High	Neomarkers: Keratin 8/18 Ab-1; 5D3; 1:150
Cytokeratin Pan	Dako: M3515; AE1/AE3; 1:100
Vimentin	Biogenex: MU074-UC; 1:60 000
S-100	Dako: Z0311; 1:5000
Melanosome	Dako: M0634; HMB-45; 1:100
Melan A	Dako: M7196; A103/MART-1; 1:100
CD1A	Novocastra: NCL-CD1a-235; 1:30
Tryptase	Dako: M7052; 1:1000

Liuosten valmistuksen jälkeen näytteistä poistettiin parafiini ja ne vietiin laskevan alkoholisarjan kautta veteen. Värjäysohje kokonaisuudessaan on työn lopussa liitteenä (liite 3, s. 64-67). Antigeenien paljastamiseksi näytteille tehtiin esikäsitteily mikroaaltouunissa. Näytelasit laitettiin muoviseen värjäysmaljaan, joka täytettiin antigeenin paljastusliuoksella. Tampereen yliopiston Lääketieteen laitoksella mikroaaltouuniesikäsitteily on optimoitu kahdelle täydelle värjäysmaljalle riippumatta varsinaisten näytteiden määrästä. Maljat täytettiin tyhjillä objektilaseilla, jotta esikäsitteilyolosuhteet saatiin vakioitua. ”Ylimääräinen” malja täytettiin tislattulla vedellä.

Esikäsitteily oli kaksivaiheinen ja mikroaaltouunissa käytettiin 850W:n tehoa. Kumpikin käsittely kesti seitsemän minuuttia. Mikroaaltokäsittelyiden jälkeen haihtunut neste korvattiin tislattulla vedellä ja maljat jätettiin lopuksi jäähtymään huoneenlämpötilaan. Ennen värjäyksen aloittamista lasit siirrettiin tislattuun veteen. Huomasimme ensimmäisen mikroaaltouunikäsittelyn jälkeen näytteitä sisältävän maljan antigeenin paljastusliuoksen värin muuttuneen hennon punertavaksi. Pohdimme syitä tähän yhdessä Marja-Leena Koskisen kanssa ja hän

epäili värin johtuvan maljan likaisuudesta. Maljaa oli mahdollisesti aikaisemmin käytetty eosiinivärjäyksessä. Lopputuloksiin tämä ei kuitenkaan vaikuttanut eosiinien pienestä pitoisuudesta johtuen.

Värjäys oli monivaiheinen ja sisälsi useita puskuripesuja. Laseja pidettiin puskurissa viisi minuuttia liuosta välillä vaihtaen. Tämän jälkeen näytteiden päälle lisättiin testattavat primaarivasta-aineet, näytelasien ollessa kosteassa inkubaatiokammiossa 30 minuuttia. Näytteet eivät saa missään prosessin vaiheessa kuivua. Primaarivasta-aineen lisäyksen jälkeen näytteistä poistettiin endogeeninen peroksidaasi HP Block –reagenssilla.

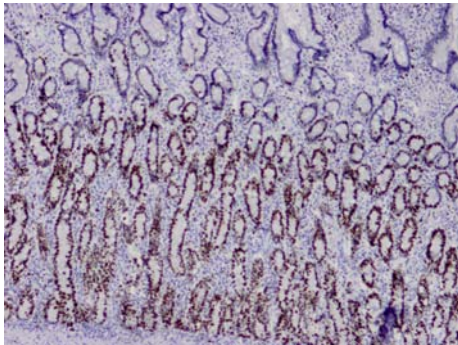
Seuraavassa vaiheessa näytteiden päälle pipetoitiin sekundaarivasta-ainetta, jonka annettiin inkuboitua 30 minuuttia. Tällä välin valmistimme DAB-reagenssin, yhdistämällä DAB –kromogeenin ja substraattipuskurin. DAB:n lisäyksen jälkeen vastavärjäsimme tumat Harrisin hematoksyliinilla. Lopuksi näytteet kuljetettiin nousevan alkoholisarjan kautta ksyleeniin ja päällystettiin.

### Värjäystulokset

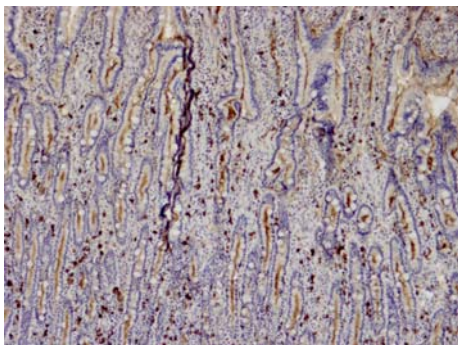
Mikroskopoimme näytteitä yhdessä erikoislaboratoriomestari Marja-Leena Koskisen kanssa jo kokeellisen osuuden suorituspäivänä. Totesimme alustavasti värjäysten onnistuneen, eikä esimerkiksi taustavärjäytymistä esiintynyt. Lopulliset vastaukset eri vasta-aineiden toimivuudesta antoi ohjaajamme Teemu Honkanen (taulukko 4, s. 52). Koiran ohutsuoli värjäytyi positiivisesti seuraavilla vasta-aineilla: MIB-1, Kappa, Lambda, CK-Low, CK-Pan, Vimentin sekä S-100, jonka värjäytyminen ei kuitenkaan ollut optimaalista. Iho värjäytyi positiivisesti vasta-aineilla CK 5/6 ja HMB-45. Negatiivisen värjäystuloksen antoivat Melan A, CD1A, Tryptase sekä CK-High. Kuvissa 3-10 (s. 52-54) on positiivisen värjäystuloksen antaneet vasta-aineet. Alustavan testauksen pohjalta voidaan olettaa, että positiivisen värjäystuloksen antaneet humaanivasta-aineet toimivat koiran kudoksissa. Negatiivisen värjäystuloksen antaneita vasta-aineita tulee testata lisää sekä harkita uusien vasta-aineiden mukaan ottamista. Ei-optimaalisesti värjäytyneiden näytteiden kohdalla syy voi olla vasta-aineiden laimennoksissa. Niitä muuttamalla voidaan päästä toivottuun lopputulokseen. (Honkanen 2009.)

## TAULUKKO 4. Vasta-aineiden testaustulokset.

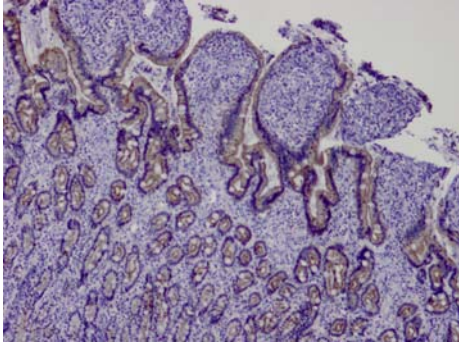
Testattava vasta-aine	Kudos	Tulos
Cytokeratin 5/6	Iho	Pos.
MIB-1 (Ki-67)	Suoli	Pos.
Kappa	Suoli	Pos.
Lambda	Suoli	Pos.
Cytokeratin Low	Suoli	Pos.
Cytokeratin High	Suoli	Neg.
Cytokeratin Pan	Suoli	Pos.
Vimentin	Suoli	Pos.
S-100	Suoli	Ei optim.
HMB-45	Iho	Pos.
Melan A	Iho	Neg.
CD1A	Iho	Neg.
Tryptase	Iho	Neg.
Tryptase	Suoli	Neg.



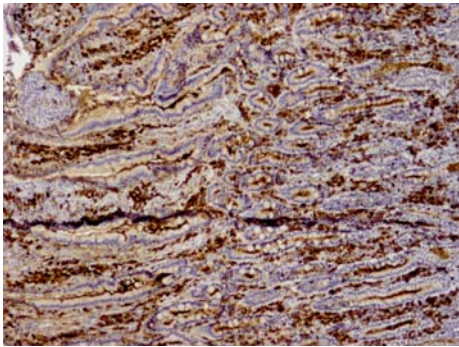
KUVA 3. MIB-1, koiran ohutsuoli (Honkanen, 2009).



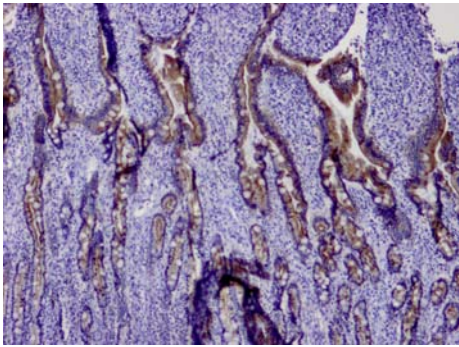
KUVA 4. Kappa, koiran ohutsuoli (Honkanen, 2009).



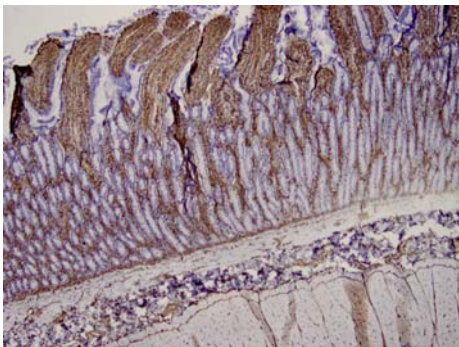
KUVA 5. Cytokeratin-Pan, koiran ohutsuoli (Honkanen, 2009).



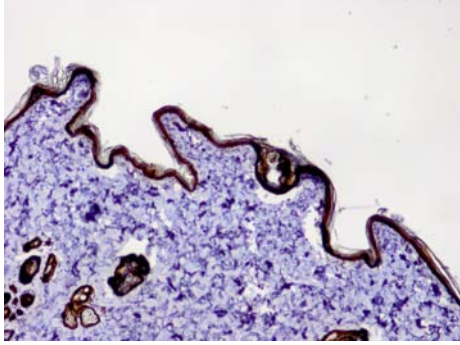
KUVA 6. Lambda, koiran ohutsuoli (Honkanen, 2009).



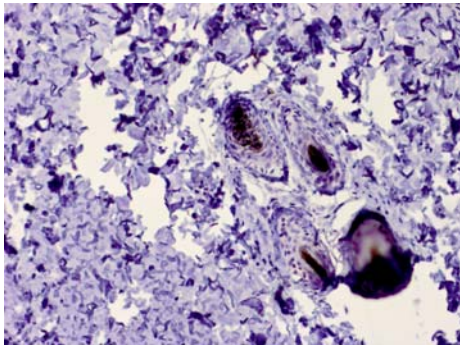
KUVA 7. Cytokeratin-Low, koiran ohutsuoli (Honkanen, 2009).



KUVA 8. Vimentin, koiran ohutsuoli (Honkanen, 2009).



KUVA 9. Cytokeratin 5/6, koiran iho (Honkanen, 2009).



KUVA 10. HMB-45, koiran iho (Honkanen, 2009).

## 9 POHDINTA

Aloitimme opinnäytetyöprosessin tutustumalla aiheesta kertovaan peruskirjallisuuteen. Pitkän ja työntäyteisen vuoden aikana olemme oppineet paljon ja aihe on osoittautunut vielä odotettuakin kiinnostavammaksi. Lähdemateriaalin kerääminen työtämme varten oli haastavaa, koska Suomessa immunohistokemia eläinten kasvaindiagnoosiikassa on vielä kartoittamaton alue. Englanninkielistä kirjallisuutta aiheesta löytyikin paljon.

Vaikka kirjallisuus joiltain osin oli melko vanhaa, on se alan peruskirjallisuutta ja perustana myös uudemmille teoksille ja tutkimuksille. Pidämme käytettyä lähdemateriaalia luotettavana koska se oli kattava ja koostui eläinlääketieteen ja lääketieteen sekä laboratorioalan teoksista, jotka ovat alan asiantuntijoiden kirjoittamia. Internetlähteiden luotettavuuden arvioiminen oli vaikeampaa. Käyttämämme internetmateriaali on pääasiassa alan lehdissä julkaistuja artikkeleita.

Teimme opinnäytetyömme parityönä, joka osoittautui haastavaksi, joskin myös mukavaksi. Aikataulujen yhteensovittaminen oli välillä ongelmallista, etenkin eri paikkakunnilla suoritettujen pitkän harjoittelujakson aikana. Parityöskentely herätti keskustelua ja toi esiin erilaisia näkökulmia asioihin, mikä mielestämme lisää osaltaan opinnäytetyömme luotettavuutta. Työtä tehdessämme esiin on noussut myös useita jatkotutkimusaiheita. Tätä jo aloittamaamme työtä voisi laajentaa käsittelemään myös muita eläimiä ja syöpätyyppejä.

Opinnäytetyömme aihe oli mielenkiintoinen, ajankohtainen ja käytännönläheinen. Työn tekeminen oli motivoivaa, sillä eläimet ja niiden hyvinvointi on meille molemmille tärkeää. Koemme rakkautemme eläimiin kantaneen meitä eteenpäin läpi prosessin. Uskomme tehdystä työstä olevan hyötyä meille myös jatkossa. Jäämme mielenkiinnolla odottamaan mullistaako immunohistokemia tulevaisuudessa koirien kasvaindiagnoosiikan myös meillä täällä Suomessa. Nyt maaliviivalla haluammekin kiittää ohjaajamme Teemu Honkasta ja Immo Rantalaa perusteellisesta ja kärsivällisestä ohjauksesta prosessin aikana.

## LÄHTEET

Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Hämeen ammattikorkeakoulu. Luettu 14.9.2009. <http://www.joensuu.fi/fld/afinla2003/abstracts.pdf>.

Airaksinen, T. & Vilkkä, H. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Tammi.

Animal Disease Research & Diagnostic Laboratory. South Dakota State University 2001. Immunohistochemistry Database & Virtual Control-Tissue Bank. Luettu 12.1.2009. <http://ihc.sdstate.org/>.

Bath-Brunswick Veterinary Associates, Inc. 2000. Cancer and Chemotherapy. Luettu 18.8.2009. [http://vetmedicine.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?zi=1/XJ&sdn=vetmedicine&cdn=homegarden&tm=42&f=00&su=p946.1.250.ip\\_p284.9.336.ip\\_p812.0.336.ip\\_&tt=2&bt=1&bts=1&zu=http%3A//www.bathbrunswickvet.com/library/cancer1.html%3FarticleID%3D3](http://vetmedicine.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?zi=1/XJ&sdn=vetmedicine&cdn=homegarden&tm=42&f=00&su=p946.1.250.ip_p284.9.336.ip_p812.0.336.ip_&tt=2&bt=1&bts=1&zu=http%3A//www.bathbrunswickvet.com/library/cancer1.html%3FarticleID%3D3).

Boenisch, T. 2006. Basic enzymology. Teoksessa Key, M. (toim.) Immunochemical Staining Methods Fourth Edition. California: DakoCytomation, 19-25.

Cangul, T. Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumors. 2001. Veterinary Sciences Tomorrow. Luettu 2.2.2009. <http://www.vetscite.org/publish/articles/000038/print.html>.

CanineCancer.com. 2008. Cancer facts. Luettu 8.11.2008. <http://www.caninecancer.com/cancer1.html>.

CanineCancer.com. 2009. Skin Cancer. Luettu 17.8.2009. <http://www.caninecancer.com/skincancer.html>.

Cullen, J.M., Page, R. & Misdorp, W. 2002. An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. Teoksessa Meuten, D.J. (toim.) Tumors in Domestic Animals. 4<sup>th</sup> Edition. Iowa: A Blackwell Publishing Company, 3-44.

Davol, P. 2000. Cancer In The Canine. Part 2. Veterinary Oncology and the Dog. Luettu 29.11.2008. <http://www.labbies.com/cancer2.htm#Lymphoma>.

Davol, P. 2000. Cancer In The Canine. Part 2. Veterinary Oncology and the Dog. Luettu 2.2.2009. <http://www.labbies.com/cancerintro.htm>

Eldredge, D.M., Carlson, L.D., Carlson, D.G. & Giffin, J.M. 2007. Dog Owner's Home Veterinary Handbook. 4<sup>th</sup> Edition. New Jersey: Wiley Publishing, Inc.

Farmilo, A.J. & Stead, R.H. 2006. Fixation and Processing. Teoksessa Key, M. (toim.) Immunochemical Staining Methods Fourth Edition. California: DakoCytomation, 27-33.

Fogle, B. 2004. Koiran vaivat. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Perhemedia Oy.



Goldschmidt, M.H. & Hendrick, M.J. 2002. Tumors of the Skin and Soft Tissues. Teoksessa Meuten, D.J. (toim.) Tumors in Domestic Animals. 4th Edition. Iowa: A Blackwell Publishing Company, 45-117.

Gross, T.L., Ihrke, P.J., Walder, E.J. & Affolter, V.K. 2005. Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2<sup>nd</sup> Edition. Iowa: A Blackwell Publishing Company.

Hakulinen, T. 2005. Ihosyövät tänään ja tulevaisuudessa. Ihosyövät. Syöpäsäätiön XXXII Symposiumi 10.-11.2.2005. Focus Oncologiae - Syöpäsäätiön julkaisusarja No 5, 8-13.

Hayat, M. A. 2002. Microscopy, immunohistochemistry and antigen retrieval methods for light and electron microscopy. Luettu 2.2.2009.  
[http://books.google.fi/books?id=8F4PbVVT2toC&dq=microscopy+immunohistochemistry%2Bantigen&printsec=frontcover&source=bl&ots=SSytMXa4eT&sig=UKzFurExb16AzYhYcBlce3emlJ8&hl=fi&ei=VkgVSuvsDI3BsAazzsG-Cg&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=6](http://books.google.fi/books?id=8F4PbVVT2toC&dq=microscopy+immunohistochemistry%2Bantigen&printsec=frontcover&source=bl&ots=SSytMXa4eT&sig=UKzFurExb16AzYhYcBlce3emlJ8&hl=fi&ei=VkgVSuvsDI3BsAazzsG-Cg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6).

Heiskanen-Haarala, I. 2007. Geeniprofiili kertoo sairastumisriskin. Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkko-Husari 5/2007. Luettu 24.4.2009.  
<http://www.hus.fi/default.asp?path=1;46;14828;14829;7967;19550;19559;19562&print=1>.

Hiltunen, E., Holmberg, P., Kaikkonen, M., Lindblom-Yläne, S. & Nienstedt, W. K. (toim.). 2003. Galenos. Ihmiselimitys kohtaa ympäristön. 1.-3. painos. Helsinki: WSOY.

Histola Research Oy. 2007. Luettu 23.5.2009. <http://www.histola.fi/etusivu/>.

Hladik, C.L. & White, C.L. 2008. Immunohistochemistry Quality Control. Teoksessa Bancroft, J.D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practise of Histological Techniques. 6<sup>th</sup> Edition. China: Churchill Livingstone Elsevier, 473-491.

Honkanen, T. 2009. Sähköpostit. 19.8.-24.9.2009. Histola Research Oy.

Huotari-Orava, R. 2005. Histopatologian sudenkuopat ihosyöpien diagnostiikassa. Ihosyövät. Syöpäsäätiön XXXII Symposiumi 10.-11.2.2005. Focus Oncologiae - Syöpäsäätiön julkaisusarja No 5, 53-55.

Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.) Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim, 966.

Jackson, P. 2007. Quality assurance in immunochemistry. Teoksessa Renshaw, S. (toim.) Immunohistochemistry. Great Britain: Scion publishing Ltd, 205-237.

Jackson, P. & Blythe, D. 2008. Immunohistochemical Techniques. Teoksessa Bancroft, J.D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practise of Histological Techniques. 6<sup>th</sup> Edition. China: Churchill Livingstone Elsevier, 433-472.

Isola, J. 1999. Miten syöpä syntyy. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. & Teppo, L. (toim.) Syöpätaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 12-22.

Isola, J. 2007. Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa Joensuu, H. Roberts, P., Teppo, L. & Tenhunen M. (toim.) Syöpätaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 16-33.

Juhanoja, J., Aalto, J., Sallinen, P. & Kainulainen, H. 1998. Digitaalinen kuva ja kuva-analyysi. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino, 225-238.

Karvonen, J. 2003. Ihon kasvaimet. Teoksessa Hannuksela, M. Karvonen, J. Reunala, T & Suhonen, R. (toim.) Ihotaudit. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 270-296.

Key, M. 2006. Immunochemical Staining Methods Fourth Edition. California: DakoCytomation.

Koenig, A., Wojcieszyn, J., Weeks, B.R. & Modiano, J.F. 2001. Expression of S100a, Vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in Seven Canine Melanoma Cell Lines and Twenty-nine Retrospective Cases of Canine Melanoma. *Veterinary Pathology* 38, 427-435.

Koulu, L. 2003. Ihon pigmenttimuutokset. Teoksessa Hannuksela, M. Karvonen, J. Reunala, T & Suhonen, R. (toim.) Ihotaudit. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 263-269.

Kustannus Oy Duodecim. 2005. Melanooman immunohistokemiaa. Luettu 21.5.2009. [http://www.kaypahoito.fi/kh/kh\\_julkaisu.NaytaArtikkeli?p\\_artikkeli=nix00444](http://www.kaypahoito.fi/kh/kh_julkaisu.NaytaArtikkeli?p_artikkeli=nix00444).

Laasonen, A. 2001. Esivalmistelut immunohistokemiallista värjäystä varten. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) 2002. Immunohistokemian peruskurssi. Kuopio: Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus, 12-17.

Mardle, S. 2007. The selection of reporter labels. Teoksessa Renshaw, S. (toim.) Immunohistochemistry. Great Britain: Scion publishing Ltd, 33-44.

Medix Laboratoriot. 2008. Histologinen tutkimus, kudosnäyte. Luettu 19.8.2009. <http://www.medix.fi/do.xsp?viewType=productview&redirect1=%2Fdo.xsp%3FobjectTy-pe%3Dproduct%26viewType%3Dlistview%26SID%3D1C3F3B76EBCE95BB7FB2&objectType=product&directoryType=&productOID=171>.

Miller, K. 2002. Immunocytochemical techniques. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 5. painos China: Churchill Livingstone, 421- 464.

Morris Animal Foundation. 2009. Dog Breeds Most Likely to Get Cancer. Luettu 20.9.2009. <http://www.morrisanimalfoundation.org/pdf/93.pdf>.

Morris, J. & Dobson, J. 2001. *Small Animal Oncology*. Iowa: A Blackwell Science Company.

NCBI. 2007. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. Luettu 29.11.2008.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653794?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_DiscoveryPanel.Pubmed\\_Discovery\\_RA&linkpos=4&log\\$=relatedreviews&logdbfrom=pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653794?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_Discovery_RA&linkpos=4&log$=relatedreviews&logdbfrom=pubmed).

Naukkarinen, A. (toim.) 2008. Histologiset menetelmät. Hematoksyliini-eosiini- ja Weigert van Gieson –värjäykset. 9. painos. Kuopio: Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus. 38-43.

Naukkarinen, A. (toim.) 2008. Histologiset menetelmät. Histologisia erikoisvärjäyksiä. 9. painos. Kuopio: Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus. 52-63.

Naukkarinen, A. (toim.) 2002. Immunohistokemian peruskurssi. 2. painos. Kuopio: Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus.

Naukkarinen, A. & Von Boguslawsky, K. 1998. Immunohistokemia. Teoksessa Lounatmaa, K. & Rantala, I. (toim.) *Biologinen valomikroskopia* Helsinki: Yliopistopaino, 133- 159.

Nikkarinen, T. (referaatti S. Pyrhösen ja L. Tepon haastattelusta). 2008. Syöpätautien synty ja solubiologia. Helsingin yliopiston Avoin yliopisto. Luettu 31.1.2009. [http://www.avoin.helsinki.fi/laaketiede/S10\\_1.html](http://www.avoin.helsinki.fi/laaketiede/S10_1.html).

Niskanen, M. 2006. Histologisen näytteen prosessointi. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) 2008. Histologiset menetelmät. 9. painos. Kuopio: Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus, 11-19.

Polak, J. M. & Van Noorden, S. 2003. *Introduction to immunocytochemistry*. 3rd edition. Trowbridge: BIOS Scientific Publishers Ltd, xiii.

Ramos-Vara, J., Beissenhertz, M., Miller, M., Johnson, G., Pace, L., Fard, A. & Kottler, S. 2000. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. *Veterinary Pathology* 37, 597-608.

Rantala, I. 2002. Immunoentsyymimenetelmien perusteet. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 2. painos. Kuopio: Kuopion yliopisto. Koulutus- ja kehittämiskeskus, 18–27; 34-41.

Rantala, I. 2008. Sähköposti 2.9.2008. Tampere. Histola Research Oy.

Rantala, I., Naukkarinen, A. & Helin, H. 1998. Histologia. Teoksessa Lounatmaa, K. & Rantala, I. (toim.) *Biologinen valomikroskopia* Helsinki: Yliopistopaino, 65-80.

Rasmussen, O. 2006. Controls. Teoksessa Key, M. (toim.) *Immunochemical Staining Methods Fourth Edition*. California: DakoCytomation, 113-118.

Renshaw, S. 2007. *Immunochemical staining techniques*. Teoksessa Renshaw, S. (toim.) *Immunohistochemistry*. Great Britain: Scion publishing Ltd, 45-96.

Saksela, O. 2005. Ihosyöpien kliininen diagnostiikka. Ihosyövät. Syöpäsäätiön XXXII Symposiumi 10.-11.2.2005. *Focus Oncologiae - Syöpäsäätiön julkaisusarja No 5*, 42-52.

Seppälä, I. J. T. 2005. Vasta-aineet eli immunoglobuliinit. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.) *Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1*. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim, 624-626.

Silvola, K. 1999. Koira on osa yhteiskuntaamme – Myös sillä on oikeuksia. *Koiramme* 103 (3), 29-31.

Snellman, E. 2005. Ultraviolettisäteily ihosyövän riskitekijänä. Ihosyövät. Syöpäsäätiön XXXII Symposiumi 10.-11.2.2005. *Focus Oncologiae - Syöpäsäätiön julkaisusarja No 5*, 14-18.

Smith, S., Goldschmidt, M. & McManus, P. 2002. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasm. *Veterinary Pathology* 39, 651-678.

Solunetti. 2006. Esisyöpägeenit ja syöpägeenit. Luettu 31.1.2009. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/syovan\\_synty/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/syovan_synty/2/).

Sulaimon, S.S., Kitchell, B.E. & Ehrhart, E.J. 2002. Immunohistochemical Detection of Melanoma –specific Antigens in Spontaneous Canine Melanoma. *Journal of Comparative Pathology* 127, 162-168.

Suomen Kennelliitto – Finska Kennelklubben ry. 2008. Koira. Luettu 8.11.2008. <http://www.kennelliitto.fi/FI/koira/Etusivu.htm>.

Suominen, E. & Pyrhönen, S. 2007. Ihosyöpä. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P., Teppo, L. & Tenhunen, M. (toim.) Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 543-556.

Tolonen, M. 2007. Melanooma (tummasolusyöpä). Luettu 21.5.2009. <http://www.biovita.fi/suomi/terveyssivut/melanoma.html>.

Virtuaaliammattikorkeakoulu. 2008. Opinnäytetyön ohjausprosessi. Luettu 20.4.2009. <https://www.amk.fi/opintojaksot/030906/1113558655385.html.stx>.

Vuoristo, M-S. 2005. Melanoomarokotteet. Ihosyövät. Syöpäsäätiön XXXII Symposiumi 10.-11.2.2005. *Focus Oncologiae - Syöpäsäätiön julkaisusarja No 5*, 88-90.

World Small Animal Veterinary Association. 2008. *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress*. Ireland: Dublin.

LIITTEET

LIITE 1: 1 (2)

**IMMUNOHISTOKEMIAA HARJOITAVIA ELÄINLABORATORIOITA  
YHDYSVALLOISSA**Yhteystiedot:

Colorado State University Veterinary Diagnostic Laboratories  
Dr. Debra Kamstock  
kamstock@colostate.edu

Animal Health Lab-University of Guelph-Ontario-Canada  
Dr. Josepha DeLay  
jdelay@lsd.uoguelph.ca

Illinois Department of Agriculture Animal Disease Laboratory  
Dr. Dale Webb  
dwebb@agr.state.il.us

University of Illinois-Veterinary Diagnostic Laboratory  
vldirectoroffice@cvm.uiuc.edu

Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory-Purdue University  
Dr. José Ramos-Vara  
ramosja@purdue.edu

Kansas State University  
Ms. Cindy Chard-Bergstrom  
ChardB@vet.k-state.edu

Animal Health Diagnostic Laboratory-Michigan State University  
Dr. Matti Kiupel  
kiupel@dcpah.msu.edu

University of Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory  
vdl@umn.edu

University of Missouri Veterinary Diagnostic Laboratory  
Marilyn Beissenherz  
BeissenherzM@missouri.edu

Canadian Food Inspection Agency (Manitoba)/Canadian Center for Foreign  
Animal Disease  
Dr. Stephanie Czub  
Czubs@inspection.gc.ca

(jatkuu)

North Dakota Veterinary Diagnostic Laboratory  
Jessie Schultz  
Jessie.Schultz@ndsu.edu

LIITE 1: 2 (2)

University of Nebraska Veterinary Diagnostic Center  
Dr. Bruce Brodersen  
bbrodersen1@unl.edu

Cornell Veterinary Medicine-Diagnostic Laboratory  
Dr. Brian Summers  
bas2@cornell.edu

Oklahoma State University-Oklahoma Animal Disease Diagnostic Laboratory  
Gregory Campbell  
gregory.campbell@okstate.edu

Oregon State University Veterinary Diagnostic Laboratory  
Ms. Veronica Johnson  
veronica.johnson@oregonstate.edu

Onderstepoort South Africa Diagnostic Lab  
Dr. Sarah Clift  
sarah.clift@up.ac.za

South Dakota State University-Animal Disease Research & Diagnostic Laboratory  
Dr. Tanya D. Graham  
Tanya.Graham@sdstate.edu

Prairie Diagnostic Services-Saskatchewan-Canada  
pds.info@usask.ca

Washington Animal Disease Diagnostic Laboratory  
Dr. Timothy Baszler  
baszler@vetmed.wsu.edu

Wyoming State Veterinary Laboratory  
Dr. Don Montgomery  
montgome@uwyo.edu

The University of Tennessee College of Veterinary Medicine  
Dr. Shelley Newman, sjnewman@mail.ag.utk.edu

Lähde: South Dakota State University. Animal Disease Research & Diagnostic Laboratory. 2009. Immunohistochemistry Database & Virtual Control-Tissue Bank. Luettu 12.1.2009. <http://ihc.sdstate.org/>.

## YLEISIMMÄT KOIRIEN KASVAINDIAGNOSTIIKASSA KÄYTETTÄVÄT VASTA-AINEET

### Yleisimmät humaanivasta-aineet:

Actin-sarcomeric  
 Actin-smooth muscle  
 Calcitonin  
 CD 3  
 CD 31  
 CD 79a  
 Chromogranin A  
 Cytokeratin AE1/AE3  
 Cytokeratin Pan  
 Desmin  
 Factor VIII (von Willebrand's factor)  
 Glial fibrillary acid protein (GFAP)  
 Glucagon  
 Insulin  
 KI-67  
 Lambda (I) Light chains  
 Lysozyme  
 Mac-387 (myeloid histiocytic antigen)  
 Melan A  
 Myoglobin  
 Neurofilament  
 Neuron Specific Enolase (NSE)  
 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)  
 S-100  
 Somatostatin  
 Synaptophysin  
 Thyroglobulin  
 Vimentin

### Yleisimmät koirien vasta-aineet:

CD-1A  
 CD 3  
 CD 4  
 CD 8  
 CD 11a  
 CD 11d  
 CD 18  
 CD 21  
 CD 34  
 CD 45  
 CD 45RA  
 CD 49D  
 Ig A  
 Ig G –H&L chains  
 Ig G  
 Ig M  
 MHC II  
 Thy 1

**TYÖOHJE:****10mM TRIS-HCl 1mM EDTA ANTIGEEENIN PALJASTUSLIUOS, pH 9,0**

Liuoksen valmistus (1 l)

1. Liuotetaan 1,211 g TRIS –jauhetta (Sigma 7-9<sup>®</sup>) 1000 ml:n dekantterilasissa noin 800 ml:aa aquaa.
2. Liuotetaan 372 mg EDTA:a (Titriplex III) edelliseen liuokseen.
3. Säädetään pH 9,0:aan 1M suolahapolla (Riedel 30721).
4. Siirretään liuos 1000 ml:n mittapulloon ja täytetään merkkiin aqualla. Sekoitetaan.

**TYÖOHJE:****0,05 M TRIS-HCl + Tween 20 pH 7,2, PUSKURILIUOS**

1. Valmistetaan kantaliuos liuottamalla 15,1425 g TRIS –jauhetta (Sigma 7-9<sup>®</sup>) mittapullossa 250 ml:aa aquaa.
2. Lisätään 200 ml:aan kantaliuosta 1600 ml aquaa.
3. Sekoitus magneettisekoittajassa.
4. Lisätään 1 M suolahappoa (Riedel 30721) pienin annoksin mittaamalla pH:ta koko ajan. pH säädetään 7,2:een.
5. Lisätään loppu aqua niin että liuosta tulee kaksi litraa.
6. Lisätään 400 µl Tween 20. Sekoitus varovasti.

**TYÖOHJE:****DAB –REAGENSIN VALMISTUS**

Yhdistä 30 µg kromogeenia 1,5 ml:aan substraattipuskuria. Sekoita.

Huomioi että DAB on karsinogeeni → käsiteltävä varoen.

(jatkuu)



**VÄRJÄYSOHJE:****Dako REAL™ EnVision™ Detection System**

1. Leikkaa 4-5 µm:n paksuiset kudokset Superfrost plus-laseille
2. Kiinnitä leikkeet lämpökaapissa 1h / 60°C
3. Poista parafiini ksyleenissä 3 x 5 min.
  
4. Laskeva alkoholisarja
 

abs.alkoholi	2 x 2min.	
96 %		2 min.
94 %		2 min.
70 %		2 min.
Tislattu vesi		
  
5. Antigeenien paljastus mikroaaltouuniesikäsittelyllä (850 W) 2 x 7 min.

24 objektilasia laitetaan objektilasitelineessä muoviseen värjäysmaljaan. Lisätään kylmää antigeenin paljastusliuosta niin, että lasit peittyvät. Varustetaan toinen malja, jossa on myös 24 lasia täyttäen se huoneenlämpöisellä tislattulla vedellä. Maljoissa on oltava aina 24 lasia riippumatta värjättävien lasien lukumäärästä. Kannet laitetaan poikittain värjäysmaljojen päälle.

Värjäysmaljat laitetaan suurempaan muoviseen astiaan ja kansi osittain suuremman astian päälle. Ensimmäisen mikroaaltokäsittelyn jälkeen mahdollisesti haihtunut neste korvataan huoneenlämpöisellä tislattulla vedellä. Tämän jälkeen mikroaaltokäsittely uusitaan, samoin kun tislattun veden lisääminen.

6. Anna näytelasien jäähtyä antigeenien paljastusliuoksessa 20 min.

## LIITE 3: 3 (4)

7. Tislattu vesi 2 min.
8. Puskuriliuos 5 min. Vaihda liuos kerran pesun aikana.
9. Primaarivasta-aineiden lisäys (100µl / näyte) kosteassa kammiossa. Inkubaatioaika 30 min.
  - a. Cytokeratin Pan suoli
  - b. Cytokeratin 5/6 iho
  - c. Cytokeratin High suoli
  - d. Cytokeratin Low suoli
  - e. HMB45 iho
  - f. Melan A iho
  - g. Tryptase iho ja suoli samalla lasilla
  - h. S-100 suoli
  - i. Vimentin suoli
  - j. CD-1A iho
  - k. Kappa suoli
  - l. Lambda suoli
  - m. MIB-1 (Ki-67) suoli
10. Puskuriliuos 5 min. Vaihda liuos kerran pesun aikana.
11. Endogeeninen peroksidaasi poistetaan HP Block –reagenssilla. Lisää reagenssi näytteiden päälle kosteassa kammiossa, anna inkuboitua 5 min.
12. Puskuriliuos 5 min. Vaihda liuos kerran pesun aikana.
13. Sekundaarivasta-aineen lisäys (100µl / näyte) kosteassa kammiossa. Inkubaatioaika 30 min.
14. Puskuriliuos 5 min. Vaihda liuos kerran pesun aikana.

## LIITE 3: 4 (4)

15. DAB -reagenssin lisäys kosteassa kammiossa, inkubaatioaika 5 min.

16. Puskuriliuos 5 min. Vaihda liuos kerran pesun aikana.

17. Tislattu vesi 1 min.

18. Harrisin hematoksyliini 1 min.

19. Juokseva vesi 7 min.

20. Tislattu vesi > 1 min.

21. Nouseva alkoholisarja	70 %	2 min.
	94 %	2 min.
	96 %	2 min.
	abs.alkoholi	2 x 2 min.

22. Ksyleeni 3 x 5 min.

23. Petaus