

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikka

Patologia

2016

Maria Rostedt

KUDOSTEN LAADUN VERTAILU TMA GRAND MASTERILLA (3D HISTECH)



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Maria Rostedt

KUDOSTEN LAADUN VERTAILU TMA GRAND MASTERILLA (3D HISTECH)

TMA eli Tissue microarray on innovaatio, joka mahdollistaa useiden kudosten ja valittujen histologisten alueiden kokoamisen yhdelle kudosplokille nopeasti ja kustannustehokkaasti. TMA on tärkeä ja hyödyllinen työkalu, jota käytetään histologisissa, immunohistokemiallisissa ja in situ hybridisaatio-määrityksissä. Sitä voidaan käyttää solumorfologian tutkimisessa, proteiinien ja RNA:n ilmentymisessä ja DNA:n poikkeamien tutkimisessa. Tämä menetelmä on säännöllisesti käytössä Auria Biopankissa, Turussa.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli valmistaa erilaisista kudospäytteistä monikudosplokki TMA Grand Masterilla (3D Histech) ja selvittää, onko erilaisilla kudoksilla eroavaisuuksia TMA:n laadussa. TMA Grand Master (3D Histech) käyttää uuden ajan (Ng) teknologiaa, joka perustuu hyvään suunnitteluun, digitaaliseen patologiaan ja automatisoituun kudospäyttelyyn.

Tässä opinnäytetyössä näytemateriaalina käytettiin Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin patologian yksikön luovuttamia kuuden eri potilaan kudospäytteitä. Tutkimuksessa käytettiin kahta eri kohtua, suolta, keuhkoa, rintaa ja sappirakkoa. Potilaiden henkilötietoja ei käytetty tässä tutkimuksessa ja näytteistä oli poistettu tunnistetiedot. Tuloksista ilmeni, että kohdun kudospäite saattaa aiheuttaa ongelmia TMA:ssa, mutta vaatii lisää tutkimusta.

ASIASANAT:

Histologia, Kudos, Laatu, TMA.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme | Pathology

2016 | 26

Maria Rostedt

TISSUE QUALITY EVALUATION WITH TMA GRAND MASTER (3D HISTECH)

Tissue microarray (TMA) is an innovation utilized to collect different tissues and histological areas to one specific tissue block in a rapid and cost-effective way. TMA is essential and practical tool in histological, immunohistochemically and in situ-hybridization definitions. It is used to study cell morphology, appearance of proteins and RNA and investigate DNA exceptions. This technology is routinely performed and maintained at Auria Biobank, Turku.

The purpose of this thesis is to evaluate tissue quality in TMA Grand Master (3D Histech) and highlight tissue differences and their impact on the quality of TMA. TMA Grand Master (3D Histech) applies new generations (Ng) technology, which is based on good planning, digital pathology and automatized tissue processing.

In this thesis the tissue material were from six different patients and were received from the pathology unit in Hospital District of Southwest Finland. In this research were used two different uterus, colon, lung, breast and gall bladder. Patient data was not used in this research and personal details were removed. Results demonstrates that uterus as a tissue material might cause some problem with TMA, but it requires more research.

KEYWORDS:

Histology, Tissue, Quality, TMA

SISÄLTÖ

| | |
|--|-----------|
| 1 JOHDANTO | 6 |
| 2 TEOREETTINEN TAUSTA | 7 |
| 2.1 Histologia | 7 |
| 2.2 Kudokset | 7 |
| 2.3 TMA | 8 |
| 2.4 TMA:n edut ja haitat | 11 |
| 2.5 Laatu | 12 |
| 2.6 Aikaisemmat tutkimukset | 12 |
| 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT | 15 |
| 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS | 16 |
| 4.1 Opinnäytetyön toteutus | 16 |
| 4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat | 16 |
| 4.3 Tutkimuksen suoritus | 17 |
| 5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU | 21 |
| 6 POHDINTA | 23 |
| LÄHTEET | 25 |

LIITTEET

Liite 1. Tutkimuslupa.

KUVAT

Kuva 1. TMA:n periaate 10

Kuva 2. Luovuttaja- ja vastaanottajablokit TMA Grand Master (3D Histech) laitteessa 19

TAULUKOT

Taulukko 1. Kudosnäytteet 17

Taulukko 2. Vastaanottajablokin yhteenveto 20

Taulukko 3. Tulokset 21

1 JOHDANTO

Histologiset tekniikat ovat ottaneet tärkeän roolin molekyylipatologian kehityksessä. Tissue microarray (TMA) on menetelmä, jolla voidaan arvioida useita kudospäytteitä lyhyessä ajanjaksossa. Tästä on syntynyt vahva diagnostinen työväline, jolla on merkitystä kliinisessä patologiassa ja toimii myös laadunvalvontana uusille vasta-aineille. TMA edistää tutkijoiden ja patologioiden työtä, kun halutaan tutkia ja arvioida sairauksia jo varhaisessa vaiheessa. Nykypäivänä TMA käyttää monia kudospäytteitä, jotka voidaan järjestää yhdelle parafiiniblokkille käyttäen valikoituja tekniikoita, jolla saadaan vastaanotettava blokki. (Suvarna ym. 2013.)

Uuden ajan TMA (ngTMA) painottuu hyvään suunnitteluun, digitaaliseen patologiaan ja automatisoituun kudospäytelyyn. TMA:ta voidaan kuvailla ”kudosarkis-toksi”, johon on siirretty pieniä kudospäyteitä, vaihdellen koosta 0,6-2mm, suoraan parafiinistä vastaanottavaan blokkiin. Kun käytetään pienintä kudospäyteen kokoa, voidaan mahdollistaa blokki joka sisältää 500 erilaista kohtaa useammasta kudoksesta. (Jove 2014.)

Tässä opinnäytetyössä tarkoituksena on vertailla erilaisten kudosten laatua käyttäen uuden sukupolven TMA-menetelmää. Tehtävänä on selvittää onko kudoksissa eroavaisuuksia ja vaikuttaako se laatuun TMA-menetelmässä. Tavoitteena on saatujen tulosten avulla rajata TMA:n laatua heikentäviä tekijöitä. Näitä tutkimustuloksia tullaan käyttämään Auria Biopankissa osana jatkuvaa TMA-tuotekehitystä.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Histologia

Histologia tarkoittaa kudospia eli kudosten tutkimista (Nienstedt ym. 2009). Histologian laboratoriossa tutkittavat kudokset jaetaan näytepaloihin, elimiin ja poistettuihin muutoksiin. Näytteitä otetaan leikkausten yhteydessä tai tähystyksessä. Näytepaloja otetaan silmin havaittavista muutoksista, joskus myös normaaliilta näyttäviltä alueilta, koska osa taudeista ei näy paljain silmin. Näytepalojen koko vaihtelee muutamasta millimetristä kymmeneen senttimetriin. (Bioanalytikkoliitto 2016; Karttunen ym. 2005.) Kudosnäytteet on käsiteltävä laboratoriossa, ennen kuin sitä voidaan tarkastella valomikroskooppisesti. Näytteistä voidaan tutkia syövän esiasteita, hyvänlaatuisia kasvaimia, infektioita ja muita tulehdustauteja. (Karttunen ym. 2005.)

Kudosnäytteet kiinnitetään ensin formaliinissa, jolloin kudoksen proteiinit denaturoituvat ja mikrobeista johtuva pilaantuminen pysähtyy. Kudoksen sisältämä vesi korvataan alkoholilla, jonka jälkeen se valetaan parafiiniin. Tämä käsittely vie aikaa noin vuorokauden, jonka jälkeen parafiinissä olevasta kudoksesta voidaan leikata ohuita, noin 2-7 mikrometrin paksuisia leikkeitä. (Karttunen ym. 2005.)

2.2 Kudokset

Kudokset muodostuvat soluista ja väliaineesta, joiden perusteella ne jaetaan viiteen päätyyppiin: epiteeli-, tuki-, nestemäinen-, hermo-, ja lihaskudokseen (Sand ym. 2014).

Epiteelikudos verhoaa elimistön ulko- ja sisäpintoja. Epiteelikudoksessa on paljon soluja, jotka ovat tiiviisti kiinni toisissaan. Epiteelikudos jaetaan pinta- ja rauhasepiteeliin. Pintaepiteelin tehtävänä on suojata kudoksia ja elimiä, säädel-

lä aineiden kulkua ja ottaa vastaan aistinärsykeitä. Rauhasepiteelin tehtävänä on tuottaa hormoneja ja eritteitä. (Vierimaa & Laurila 2011; Sand ym. 2014.)

Tukikudos muodostaa tukirakenteita eri elimille. Tukikudoksiin kuuluvat varsinainen sidekudos, rasvakudos, rustokudos ja luukudos. Rasvakudos jaetaan keltaiseen ja ruskeaan rasvakudokseen. Rustokudos muodostuu rustosoluista, jotka tuottavat kiinteää, mutta taipuisaa soluväliainetta. Rustokudos kestää hyvin painetta, sillä soluväliaine imee itseensä voimakkaasti vettä. (Vierimaa & Laurila 2011.)

Veri ja imuneste kuuluvat nestemäisiin kudoksiin. Nestemäisen kudoksen solut eivät ole kiinnittyneet soluväliaineeseen ja näissä ei ole soluliitoksia. Nestemäisen kudoksen solut kiertävät jatkuvasti kehon veri- ja imusuonissa. (Sand ym. 2014.)

Hermokudos muodostuu hermosoluista eli neuroneista ja hermotukisoluista eli gliasoluista. Hermosolut osallistuvat solujen toiminnan säätelyyn lähettämällä viestejä solujen välillä. (Sand ym. 2014.) Yleensä hermosolussa on yksi hermosyy eli aksoni, joka kuljettaa hermoimpulssia. (Vierimaa & Laurila 2011.)

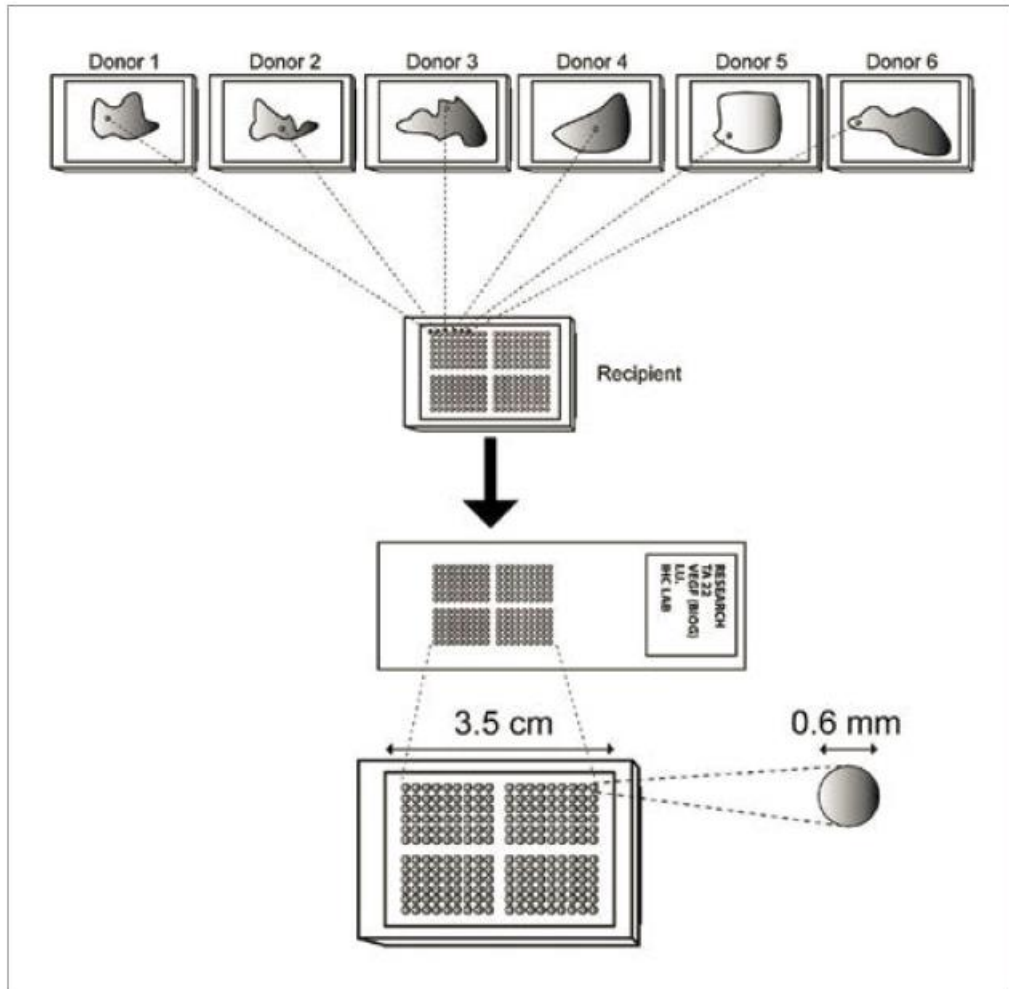
Lihaskudos jakautuu poikkijuovaiseen, sileään ja sydänlihakseen. Nämä muodostuvat lihassoluista, joita kutsutaan lihassyiksi ja niille on ominaista supistumiskyky. Soluväliainetta löytyy niukasti. (Nienstedt ym. 2009.) Poikkijuovaisesta lihaksesta ovat muodostuneet tahdonalaisesti säädeltävät luustolihakset. Sileän lihaksen toimintaa säätelee autonominen hermosto ja tietyt hormonit. (Vierimaa & Laurila 2011.)

2.3 TMA

TMA eli tissue microarray on menetelmä, jolla valmistetaan monikudosblokki. Se koostuu useista näytteistä, joka sisältää valitut kohdat alkuperäisistä kudosplokeista. TMA:lle löytyy monta käyttötarkoitusta, sitä voidaan käyttää solumorfologian tutkimisessa, proteiinin ja RNA:n ilmentymisessä ja DNA:n poikkeamien tutkimisessa sekä näiden värjäysten jälkeen tai immunohistokemialli-

sen menetelmän jälkeen ja fluoresenssi in situ-hybridisaatioissa. (Jove 2014.) Immunohistokemiallisen menetelmän tarkoitus on osoittaa antigeenin olemassaolo tai sen puuttuminen kudoksessa tai solunäytteessä. Fluoresenssi in situ-hybridisaatio (FISH) on menetelmä, jossa kiinnostuksen kohteena on jokin tietty kromosomi, geeni tai fuusiogeneeni. TMA on kvantitatiivinen menetelmä ja mahdollistaa histologian ja solumorfologian samanaikaisen arvioimisen. (Mäkinen ym. 2014.)

TMA:n kokoaminen alkaa kudoksenäytteen ja tarkan histologisen alueen valinnalla. Luovuttajablokin näytelasit skannataan tietokoneelle ja suunnitellaan haluttu TMA. Pienet kudoslieriöt porataan tavallisesta formaliiniin fiksoidusta ja parafiiniin valetusta luovuttajablokista ja siirretään vastaanottajablokkiin. Tiedot siirtyvät suoraan tietokoneelle Excel-tiedoston muodossa. (3D Histech 2016, Voduc ym. 2008; Arafa ym. 2010.) Vastaanottajablokista leikataan mikrotomilla ohuita leikkeitä, jonka jälkeen parafiini sulatetaan lasilämmittimen avulla. Näytelasit värjätään ja skannataan tietokoneelle tarkasteltavaksi. (3D Histech 2016.) TMA:n värjäyksessä suositetaan käytettävän laboratorion värjäysmenetelmiä, jotka ovat standardisoituja (Taylor C. & Rudbeck L. 2013). Tämä teknologia mahdollistaa tuhansien näytteiden nopean analysoinnin.



Kuva 1: TMA:n periaate. Tissue microarray construction and quality insurance. Taylor C. & Rudbeck L. 2013.

TMA:t voidaan luokitella kolmeen eri tyyppiin, jotka ovat yleinen, ennustava ja kokeileva TMA. Yleinen TMA on koottu syöpänäytteistä, jotka edustavat yhtä tai montaa luokkaa ilman kliinistä tai patologista informaatiota. Näitä käytetään kun halutaan määrittää muutoksen yleisyys syövän alueessa, josta ollaan kiinnostuneita. Kehittyvä TMA sisältää näytteitä, jossa on eri asteita yhdestä syövän tyyppistä. Tätä käytetään kun halutaan selvittää yhtenäisyyksiä syövän geno- ja fenotyypissä. (Suvarna ym. 2013.)

Ennustava TMA sisältää näytteitä syöivistä, joista on saatavilla seuranta-tietoa ja edustavat nopeaa ja luotettavaa menetelmää, kun arvioidaan kliinistä tärkeyttä uusissa havaituissa sairauteen liittyvissä geeneissä. Tällä voidaan tuoda julki

yhteyksiä molekyylisten löydösten ja kliinisten lopputulosten kanssa. (Suvarna ym. 2013.)

Kokeileva TMA on koottu solulinjoista tai näytteistä, joista on tehty TMA-arkisto, jolla testataan uusia vasta-aineita ja etsitään uusia geenikohteita (Suvarna ym. 2013).

Yleisimmin käytetyt lieriöiden koot TMA:ssa ovat 0,6 mm, 1,0 mm, 1,5 mm ja 2,0 mm. Pienimmän kudoslieriön käyttö mahdollistaa suuren määrän porattavia lieriöitä vastaanottavassa blokissa, mutta aiheuttavat helposti vahinkoa luovuttaja- ja vastaanottajablokissa. Suurempi kudoslieriö on yleensä vahvempi ja ei vaurioidu yhtä helposti käsittelyssä. Tästä huolimatta, suurempi kudoslieriö saattaa aiheuttaa ongelmia lieriöiden siirtämisessä vastaanottajablokkiin, jonka vuoksi blokki saattaa halkeilla. (Taylor C. & Rudbeck L. 2013.)

2.4 TMA:n edut ja haitat

TMA:n suurimpia etuja on, että se mahdollistaa kustannustehokkaan ja suuren näytemäärän käytön histologisissa, immunohistokemiallisissa ja in situ-hybridisaatio kudostyypityksissä. Tämän teknologian avulla useista sadoista näytteistä ja potilaista voidaan sisällyttää kudosalueita vain yhdelle lasille määrityksiä varten. TMA:ta käytetään kaikissa kudostyypeissä, myös dekalsifoiduissa luukudosnäytteissä. (Taylor C. & Rudbeck L. 2013; Jove 2014.) TMA:ta voidaan hyödyntää vasta-aineiden herkkyuden ja spesifisyyden arvioinnissa, kudosten fiksaatio-menetelmissä ja antigeenien uudelleenhankkimisen menetelmissä. Menetelmän käyttö luo säästöjä reagenssien hankinnoissa ja työntekijäkustannuksissa. (Cheng ym. 2013.)

Vaikka TMA on tunnetusti tehokas menetelmä, sillä on myös heikkoutensa. TMA on riippuvainen hyvästä kudoksen laadusta, asiallisesti validoiduista vasta-aineista ja standardoiduista laboratorion menetelmistä. Nykypäivänä TMA:n menetelmä on automatisoitu, mutta laadukas TMA vaatii koulutetun käyttäjän taidot. TMA on niin laadukas, kuin mistä näytteistä se on tehty. Tutkijat käyttävät usein kudoksia arkistoista hyvinkin pitkältä aikaväliltä, joka lisää muuttumis-

tekijöitä kudosten prosessoinnissa ja tulokset voivat osoittautua vääriksi. Formaliiniin fiksoidut ja parafiiniin valetut kudoksenäytteet voivat säilyttää antigeenisyyden vuosikymmeniksi, mutta tutkijoiden tulee varmistaa, ettei näytteissä esiinny korrelaatiota värjäysten intensiivisyydessä ja näytteiden iässä. (Camp ym. 2008.)

2.5 Laatu

Laadunvalvonta on tärkeä työkalu, kun halutaan tarjota parasta mahdollista hoitoa potilaalle ja henkilökunnalle. Laatu on mittari, joka koostuu piirteistä ja ominaisuuksista, johon perustuu järjestelmän, tuotteen, palvelun tai prosessin kyky täyttää vaatimukset ja odotukset. (Suvarna ym. 2013.) Hyvä laatu perustuu parhaaseen tutkittuun näyttöön, tietoon ja sille asetettujen vaatimusten ja odotusten toteutumiseen. Keskeisiä piirteitä sosiaali- ja terveydenhuollon laadussa ovat korkeatasoinen ammattitaito, asiakaskeskeisyys, potilasturvallisuus, valinnanvapaus, palvelujen saatavuus ja tuotettavuus ja vaikuttavuus. (THL 2014, Terveystieteiden tutkimuskeskus 2011.) Laadunvalvonnan mittareilla varmistetaan, etteivät tavallisesta poikkeavat, äärimmäiset vaihtelut ja muut teknilliset ongelmat ylitä biologista vaihtelua. (Burgoon ym. 2005.)

Sisäinen laadunvalvonta on tärkeä osa laadunhallintaa ja on ollut perinteinen tapa tarkistaa päivittäisiä toimintoja. Ulkoisen laadunvalvonnan mittarit tarjoavat vertailumahdollisuuden eri laboratorioden välillä ja antavat usein pääsyn parhaimpiin menetelmiin ja käytäntöihin. Kuitenkin, kokonaista laadunhallintaa tulisi käyttää, jotta voidaan varmistaa jatkuvuus, palvelun laatu, luotettavuus, standardointi ja jatkuva parantaminen kaikissa laboratorion prosesseissa. (Suvarna ym. 2013.)

2.6 Aikaisemmat tutkimukset

Dekker ym. (2012) kartoittivat HER2-geenin ilmentymistä invasiivisessa rintasyöpässä hyödyntäen TMA-menetelmää. Tutkimuksessa arvioitiin 1210 rinta-

syöpää sairastavaa potilasta, joita hoidettiin sairaaloissa vuosina 2006 – 2008 invasiivisen rintasyövän vuoksi. Suuri joukko uudelleentestattavia HER2-luokituksen rintasyöpiä todettiin käyttökelpoiseksi ja voidaan luotettavasti värjätä TMA:ssa SP3, 4B5 ja monoklonaalisella SISH- vasta-aineilla. Tätä menetelmää voidaan nyt tarjota muille laboratorioille, jotka testaavat HER2-geeniä.

Anagnostou, Lowery. Syrigos, Cagle, Rimm (2010) tekivät kvantitatiivisen arvioinnin proteiinin ilmentymisestä kudoslieriön paksuudessa TMA:ssa ja halusivat selvittää onko suurempi 1,5mm kudoslieriö parempi kuin pienempi 0,6mm. Patologit usein mieltävät, että olisi parempi käyttää suurempaa kudoslieriön kokoa, mutta mikään kirjallisuus ei todista että suurempi koko olisi parempi tai huonompi. Tutkimuksessa käytettiin rinta- ja keuhkosyöpien kudospätkiä. Tulokset osoittavat että pienempi 0,6mm kudoslieriön käyttö on yhtä edustava verrattuna suurempiin kokoihin.

Jones ja Prasad (2012) tekivät vertailevan tutkimuksen pienen kudoslieriön (0,6mm) ja suuren kudoslieriön (2mm) kilpirauhasen TMA:ssa ja halusivat selvittää onko suurempi koko parempi käytännössä. Useat tutkimukset ovat osoittaneet että 0,6mm lieriö isosta tuumorista antaisi samankaltaiset tulokset kuin koko alueesta. Kuitenkin lieriöt kolloidi-täytteisistä kilpirauhasen follikkeleista, kuten esimerkiksi rintasyövässä voivat sisältää vähemmän soluja verrattuna yhtenäiseen tuumoriin. Tutkimuksen tarkoituksena oli arvioida kilpirauhasen TMA:t valitsemalla kaksi diametriä, 0,6mm ja 2mm lieriön koko ja tutkia koon vaikutusta ja ruudun tiheyttä kokonaisissa osa-alueissa. Immunohistokemian osuus koostui ensisijaisista vasta-aineista kuten sytokeratiini 19, HBME1 ja CITED1, jotka on todettu hyödyllisiksi kilpirauhasen karsinoman diagnoosissa. Yhtäpitävyys tiheän TMA:n ja kokonaisissa alueissa sytokeratiini 19; oli 61 / 77 (79 %) HBME1; 76 / 80 (95 %) ja CITED1; 67 / 75 (89 %). Toistuvuuden ristiriitaisuus oli negatiivinen ydin mutta positiivinen keskeinen heterogeeninen proteiinin ilmentymä kokonaisissa alueissa. Kokonaisissa alueissa testien herkkyys lisääntyi, mutta tarkkuus väheni verrattuna TMA:aan, kuitenkin toistuvuus pysyi samana (77–83%). TMA säilyttää edelleen tarkan menetelmän kun halutaan

seuloa proteiinin ilmentymiä suuressa määrässä kilpirauhasen kudoksia riippumatta lieriön diametristä tai ruudukon tiheydestä.

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla erilaisten kudosten laatua TMA Grand Master (3D Histech) laitteella. Tehtävänä on selvittää onko kudoksissa eroavaisuuksia ja vaikuttaako se laatuun TMA-menetelmässä. Tavoitteena on saatujen tulosten avulla rajata TMA-laatua heikentäviä tekijöitä.

TMA:n laadullisia ongelmia ovat:

- kudoksien huono siirtyvyys luovuttajablokista
- lasin ja blokin kohdistus
- kudoksen epäonnistunut muoto lasilla
- kudoksen kovuus
- blokkien leikkautuvuus

Tässä opinnäytetyössä keskityttiin kudoksien siirtyvyyteen luovuttajablokista vastaanottajablokkiin. Näitä tutkimustuloksia tullaan käyttämään Auria Biopankissa osana jatkuvaa TMA-tuotekehitystä.

4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Tämä opinnäytetyön aihe saatiin Auria Biopankista syksyllä 2015. Tutkimuslupa (liite 1) saatiin Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiriltä 15.joulukuuta 2015. Tutkimuksen empiirinen osuus aloitettiin joulukuussa 2015 ja saatiin päätökseen tammikuussa 2016. Aineiston kirjoittaminen ja raportointi alkoi tammikuussa 2016 ja opinnäytetyö valmistui toukokuussa 2016. Tässä tutkimuksessa tutkimusympäristönä toimivat Turun yliopistollisen keskussairaalan patologian yksikkö ja Auria Biopankin toimitilat.

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivinen tutkimus perustuu muuttujien mittaamiseen ja näiden välisten yhteyksien tarkasteluun ja tilastollisten menetelmien käyttöön. Vertailevassa tutkimuksessa voidaan asettaa tutkimukselle hypoteeseja, jos niille löytyy perustelut. Kvantitatiivisen tutkimuksen tarkoitus on vahvistaa jo olemassa olevaa tietoa (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013.) Kvantitatiivisessa tutkimuksessa etsitään syysuhteita ja pyritään yleistysten avulla ennustamiseen, selityksiin ja ymmärtämiseen. Kvantitatiivinen tutkimus perustuu deduktiiviseen prosessiin eli etenee yleisestä yksityiskohtaiseen. Tarkoituksena on reliabiliuden ja validiuden kautta saavuttaa tulosten tarkkuus ja luotettavuus. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tutkitaan eri osia ja komponentteja laboratorionkokeiden, muuttujien manipuloinnin ja kontrollin kautta. (Hirsjärvi & Hurme 2011; Hirsjärvi ym. 2012.)

Tämä opinnäytetyö oli kvantitatiivinen tutkimus, koska tutkimusote perustui deduktiiviseen prosessiin eli eteni yleisestä yksityiskohtaiseen. Tässä opinnäytetyössä valittiin useita kudoksia, jotka otettiin vertailuun. Kudoksista valittiin tarkemmat histologiset alueet, joista tehtiin monikudosblokit TMA Grand Master (3D Histech) laitteella ja pyrittiin selvittämään, onko eri kudoksilla eroavaisuuksia.

sia laadun onnistumisen suhteen. Opinnäytetyössä painotettiin objektiivista havainnointia ja mittaamista. Tässä tutkimuksessa näytemateriaalina käytettiin Turun yliopistollisen keskus-sairaalan patologian yksikön luovuttamia kudospäätteitä. Potilaiden henkilötietoja ei käytetty ja tunnistetiedot poistettiin näytteistä. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 6 kudosta, jokaisesta leikattiin kolme näytettä eli yhteensä 18 näytettä. Vastaanottavia monikudospäätteitä valmistettiin 12 kappaletta.

4.3 Tutkimuksen suoritus

Tutkimustehtävänä oli verrata kuudesta eri kudoksesta tehtyjen monikudospäätteiden laadullista onnistumista TMA Grand Master (3D Histech) laitteella. Tutkimukseen käytettävät kudospäätteet kerättiin kuudelta eri ihmiseltä. Tutkimustyö aloitettiin valmistamalla kudospäätteet formaliinissa fiksoiduista kudospäätteistä Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin patologian laboratoriossa. Näytteet olivat otettu eri ajankohtina. Jokaisesta kudoksesta leikattiin kolme kudospäätettä. Kudospäätteitä oli yhteensä 18 kappaletta. Näistä kudospäätteistä porattiin 1mm:n kudospäätteitä vastaanottaviin päätteisiin Auria Biopankin tiloissa TMA Grand Master (3D Histech) laitteella.

Taulukko 1. Kudospäätteet

| Näytetyyppi | Näytteenotto pvm | Fiksointiaika (päiviä) |
|------------------|------------------|------------------------|
| 1 Kohtu | 26.11.2015 | 27 |
| 2 Kohtu | 23.11.2015 | 30 |
| 3 Keuhko | 24.11.2015 | 29 |
| 4 Sappirakko | 22.11.2015 | 31 |
| 5 Suoli (rectum) | 16.11.2015 | 37 |
| 6 Rinta | 24.11.2015 | 29 |

Pilkonnan jälkeen näytekasetit siirrettiin automatisoituun kudospäätteen kuljetukseen. Kudospäätteen kuljetuksen tarkoituksena on poistaa näytteistä vesi, rasva ja kiinnittää kudokset. Käsittely kovettaa kudospäätteet ja takaa säilyvyyden. (Mäkinen ym. 2012.) Ennen kuljetusta kudoksista pestään mahdolliset kidejäänteet fiksaatiivis-

ta, jonka jälkeen tapahtuu dehydrointi eli veden poisto nousevassa alkoholisarjassa. Dehydroinnin jälkeen kudokset kirkastetaan ksyleenillä, joka poistaa alkoholin. Alkoholin tulee poistua, koska parafiini ja alkoholi eivät ole keskenään liukenevia. (Aho H, 1999.) Lopuksi kudokset imeytetään parafiiniin.

Kuduskuljetuksen jälkeen kudospalat siirrettiin valumuottiin leikkauspinta alaspäin ja päälle valutettiin parafiiniä. Kasetti, johon oli kirjattu kudoksen nimi, valettiin kanneksi. Tämän jälkeen muotti laitettiin kylmälevylle jähmettymään. Samalla valettiin myös tyhjiä valumuotteja, joita käytettiin vastaanottajablokkeina.

Valun jälkeen kudospalasta leikattiin mikrotomin avulla parafiiniä pois pinnalta, jotta saatiin kudokset esille ja pinta tasaiseksi. Käytössä oli liukumikrotomi, jossa blokki pysyy paikallaan ja veitsi liikkuu vaakatasossa noin 40 asteen kulmassa. (Aho H. 1999.) Luovuttajablokin korkeus tulee olla vähintään 4mm. (Jove, 2014).

Leikkauksen jälkeen aloitettiin monikudospalokkien valmistaminen TMA Grand Master (3D Histech) laitteella. Luovuttaja- ja vastaanottajablokit asetettiin koneeseen niille merkityille paikoille.

Kuva 2. Luovuttaja- ja vastaanottajablokit TMA Grand Master (3D Hitech) laitteessa.



Tietokoneella suunnitellaan jokaiselle vastaanottajablokille layout eli asetelma. Tässä vaiheessa valitaan kuinka paljon halutaan porata lieriöitä ja minkälainen kuvio vastaanottajablokkiin tulee. Asetelman malli riippuu TMA:n käyttötarkoituksesta ja vaatii suunnittelua, ennen kuin kudosten poraus voidaan aloittaa. (Suvarna ym. 2013.) Tärkeää asetelman suunnittelussa on, että poraukset eivät tule liian lähelle blokin reunoja, koska se saattaa aiheuttaa blokin halkeamisen ja tällöin kudoslieriön siirto epäonnistuu.

Asetelma suunniteltiin niin, että yhteen vastaanottajablokkiin tulee saman kudonäytteen kaikista kolmesta kudusblokista poraukset. Asetelmassa oli 18 porausta jokaisesta kudusblokista. Kuusi ensimmäistä toteutettiin näin, jonka jälkeen todettiin että kudomateriaalia oli vielä hyödynnettävissä. Vastaanottajablokkien tekoa jatkettiin ja saatiin tehtyä vielä kuusi lisää. Tutkimuksessa käytetyn porauksen koko oli 1 mm.

Työssä tuli huomioida poran puhdistaminen aika-ajoin, noin 200 porauksen jälkeen pora tulee puhdistaa, koska parafiiniä alkaa kertyä poran päähän ja se saattaa aiheuttaa laadullisia ongelmia. Puhdistus tehtiin aina kolmen tehdyn monikudosblokin jälkeen eli noin 162 porauksen jälkeen.

Laite antaa jokaisesta vastaanottajablokista yhteenvedon, jossa näkyy TMA blokin nimi, luovuttajablokin nimi, parafiinin korkeus ja suora linkki kuviin.

Taulukko 2. Vastaanottajablokin yhteenvedo

| Unique TMA sample ID | TMA Block ID | TMA Block Name | Donor Block ID | Donor Block Images | Donor Core Height |
|----------------------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------------|-------------------|
| 1 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 2 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 3 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 4 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 5 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 6 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 7 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 8 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 9 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 10 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 11 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 12 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 13 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 14 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 15 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 16 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |
| 17 | RB_1 | 5.vastaanottaja | Suoli 1.1 | Donor image link | 4.6 mm |

5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Laadun vertailussa käytettiin kuuden eri ihmisen kudosnäytteitä. Vastaanottavia blokkeja valmistettiin yhteensä 12 kappaletta ja vertailussa hyödynnettiin mahdollisimman paljon kudospateriaalia.

Taulukko 3. Tulokset

| Vastaanottajablokkit | Kudoslieriöt | Onnistumis-% |
|-------------------------|--------------|--------------|
| 1. vastaanottajablokki | 48 / 48 | 100 % |
| 2. vastaanottajablokki | 54 / 54 | 100 % |
| 3. vastaanottajablokki | 54 / 54 | 100 % |
| 4. vastaanottajablokki | 53 / 54 | 98 % |
| 5. vastaanottajablokki | 54 / 54 | 100 % |
| 6. vastaanottajablokki | 54 / 54 | 100 % |
| 7. vastaanottajablokki | 48 / 54 | 89 % |
| 8. vastaanottajablokki | 40 / 40 | 100 % |
| 9. vastaanottajablokki | 54 / 54 | 100 % |
| 10. vastaanottajablokki | 54 / 54 | 100 % |
| 11. vastaanottajablokki | 38 / 41 | 93 % |
| 12. vastaanottajablokki | 54 / 54 | 100 % |

Porauksia tehtiin yhteensä 669 kappaletta, joista epäonnistuneita oli 12 kappaletta (1,8 %). Tutkimuksessa sallitun epäonnistumisen raja oli 5 %, eli kokonaisuudessaan epäonnistuneita porauksia oli vähän. Näitä epäonnistuneita porauksia oli vastaanottajablokkeissa 4, 7 ja 11 ja nämä ovat kohtu 1.3 kudosplokista. Tästä luovuttajablokkista huomattiin, että osa kudoslieriöistä olivat jääneet paikalleen ja osa oli todennäköisesti irronnut porasta siirron aikana. Ongelmia esiintyi vain yhdessä kohtunäytteessä, joten ainakin tämä yksi alue kohdusta aiheutti laadullisia ongelmia TMA:ssa. Alueen tarkkaa sijaintia kohdussa ei tiedetä.

Kaikki kudokset käsiteltiin samanaikaisesti, jotta pystyttiin seuraamaan laatua koko tutkimuksen ajan. Vastaanottavat blokkit valmistettiin käyttämällä samaa 1mm:n porauksen kokoa, asetelmaa ja noudattamalla työohjeita. Luovuttajablo-

kin korkeus tulee olla vähintään 4mm ja tässä tutkimuksessa kaikki kudosplokit saavuttivat vaaditun korkeuden.

TMA:n laatuun vaikuttaa pre-analyttiset, analyttiset ja post-analyttiset tekijät. Pre-analyttisiä tekijöitä ovat kudoksen tyyppi, biologiset vaihtelut, mittasuhteet, leikkuu, paksuus ja säilytys. Pre-analyttinen vaihe alkaa heti kun kudospala on otettu potilaasta ja silloin fiksoinnin aika on kriittinen, koska kudoksen autolyysi eli pilaantuminen alkaa heti. Fiksoinnissa vaikuttaa aika, viivästyminen, tyyppi ja volyyymi. Kudosprosessoinnissa vaikuttaa käytetty parafiini ja säilytys. Kudospala ei saa päästä missään vaiheessa kuivumaan, sillä se voi aiheuttaa morfologisia muutoksia. (Taylor C. & Rudbeck L. 2013.)

Analyttiseen vaiheeseen kuuluu TMA:n suunnittelu, kokoaminen ja värjäys. Suunnittelu ja asetelman tekeminen on kriittinen vaihe. Tässä vaiheessa tulee miettiä kuinka monta lieriötä halutaan, näiden koko, histologisen alueen valinta ja mihin tarkoitukseen TMA tulee. (Jove, 2014.) Värjäyksessä on tärkeää käyttää standardoituja värjäysmenetelmiä. TMA:sta tehdyt leikkeet ovat yleensä suuria ja vaativat huolellisuutta, jotta lasit peittyvät kaikissa värjäyksen vaiheissa. Näin vältetään epätasaisilta värjäyksiltä. (Taylor C. & Rudbeck L. 2013.)

Post-analyttisessä vaiheessa tutkija tai patologi tutkii TMA:n onnistumisen ja antaa raporttinsa. Tärkeinä tekijöinä tässä ovat henkilön ammattitaito ja kokemus. (Taylor C. & Rudbeck L. 2013).

Tarkkaa syytä on vaikeaa sanoa, miksi kohtunäyte 1.3 aiheutti epäonnistuneita porauksia TMA:ssa. Kohdun kudospala on tiivis ja kudospaljetuksen aikana xyleeni kovettaa kudoksen. (Suvana ym. 2013). Tämän vuoksi se saattaa aiheuttaa laadullisia haasteita TMA:ssa. Jatkotutkimuksen aiheena voisi olla kohtunäytteiden laadunvertailu TMA Grand Masterilla (3D Histech), jotta voitaisiin ottaa isompi joukko kohtunäytteitä vertailuun. Tämä tutkimus ei vielä johtanut johtopäätökseen, että onko eri kudoksilla vaikutusta TMA:n laatuun.

6 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli vertailla eri kudosten laatua TMA Grand Masterilla (3D Histech). Tutkimuksen suunnittelu ja toiminnallinen osuus toteutuivat aikataulun mukaisesti. Lähdemateriaalina käytettiin tieteellisiä ja luotettavia lähteitä, joista suuri osa oli englanninkielisiä.

Tälle opinnäytetyölle hankittiin tutkimuslupa Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiriltä ennen toiminnallisen osuuden aloittamista. Tutkimuksessa käytettiin kudoksenäytteitä, joista oli poistettu tunnistetiedot. Tutkimuksessa ei käytetty potilaskertomuksia. Näytteet nimettiin ja numeroitiin erikseen tutkimusta varten, jotta eri-laiset kudokset tunnistettiin tutkimuksen aikana. Toiminnallisen työn vaiheissa noudatettiin työohjeita ja työskenneltiin huolellisesti. Tuloksia ei ole vääristelty, vaan ne on esitetty rehellisesti ja totuuden mukaisesti.

Tämän tutkimuksen kaikissa vaiheissa huomioitiin eettiset lähtökohdat ja noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimuksessa käytettiin tiedeyhteisön hyväksymiä tiedonhankinta- ja tutkimusmenetelmiä. Tutkimustyössä ja tulosten esittämisessä on noudatettu johdonmukaista hallintaa, rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta. Muiden tutkijoiden töitä ja saavutuksia kunnioitettiin. (Vilkkä, 2015; Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2012.)

TMA:ssa on monta työvaihetta ja laatuun vaikuttaa monet eri tekijät. Menetelmä vaatii koulutetun käyttäjän ja tarkkuutta kaikissa työvaiheissa. Myös näytteenotto ja fiksointiaika vaikuttavat merkittävästi laatuun TMA:ssa. Tutkimuksen luotavuutta vahvistaa kudoksenäytteiden samanaikainen käsittely, huolellinen työskentely ja työohjeiden tarkka noudattaminen. Tutkimuksessa käytetyt kudoksenäytteet olivat suhteellisen tuoreita, fiksointiaika oli näytteissä 27–37 päivää. Aikaisemmista tutkimuksista käy ilmi, että pieni 0,6mm:n kudoslieriö on yhtä edustava ja laadukas kuin suurempi lieriön koko. Tämän myötä voidaan poissulkea käytetyn 1mm:n porauksen koon vaikutus laatuun tässä opinnäytetyössä.

Tutkimuksen luotettavuutta heikentää kudoksenäytteiden vähäinen määrä. Tutkimuksessa ei kuitenkaan voitu hyödyntää kaikkia haluttuja kudostyyppisiä kuten prostataa ja ihoa, koska yleensä näistä kudoksista käytetään kaikki näytemateriaali potilaan hoidon diagnosointiin. Tämän tutkimuksen myötä ei vielä päästy johtopäätökseen, vaikuttavatko eri kudokset TMA:n laatuun ja vaatii lisää tutkimista.

Tämä tutkimus antaa hyvän pohjan jatkotutkimuksille ja saatuja tuloksia voidaan hyödyntää Auria Biopankissa osana jatkuvaa laadunkehitystä. Tulevaisuuden jatkotutkimuksissa otoksen kokoa voisi laajentaa tai aiheena voisi olla kohtunäytteiden laadunvertailu TMA Grand Masterilla (3D Histech).

LÄHTEET

- Aho H. 1999. Histologiset menetelmät patologiassa. Turun yliopisto. Kliinis-teoreettinen laitos
- Anagnostou V.; Lowery F.; Syrigos K.; Cagle P. & Rimm D. 2010. Quantitative Evaluation of Protein Expression as a Function of Tissue Microarray Core Diameter
- Arafa M.; Boniver J. & Delvenne P. 2010. Progression model tissue microarray (TMA) for the study of uterine carcinomas
- Burgoon L.; Eckel-Passow J.; Gennings C.; Boverhof D.; Burt J.; Fong C. & Zacharewski T. 2005. Protocols for the assurance of microarray data quality and process control.
- Camp R.; Neumeister V. & Rimm D. 2008. A decade of tissue microarrays: Progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. Journal of Clinical Oncology.
- Cheng L.; Zhang D. & Eble J. 2013. Molecular genetic pathology. Second edition. New York: Springer science, Business Media
- Dekker T.; Borg S.; Hooijer G.; Meijer S.; Wesseling J.; Boers J.; Schuurinc E.; Bart J.; Gorp J.; Mesker W.; Kroep J.; Smit V. & Vijver M. 2012. Determining sensitivity and specificity of HER2 testing in breast cancer using a tissue micro-array approach
- Hirsjärvi S.; Remes P. & Sajavaara P. 2012. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Tammi
- Hirsjärvi S. & Hurme H. 2011. Tutkimushaastattelu: teemahaastattelun teoria ja käytäntö. 18. uudistettu painos. Helsinki: Gaudeamus
- Jones S. & Prasad M. 2012. Comparative Evaluation of High-Throughput Small-Core (0.6-mm) and Large-Core (2-mm) Thyroid Tissue Microarray
- Jove, 2014. A Next-generation Tissue Microarray (ngTMA) Protocol for Biomarker Studies <http://www.jove.com/video/51893/a-next-generation-tissue-microarray-ngtma-protocol-for-biomarker>. Viitattu 22.1.2016
- Kankkunen P. & Vehviläinen-Julkunen K. 2013. Tutkimus hoitotieteessä. 3. uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy
- Karttunen T.; Soini Y & Vuopala K. 2005. Tautioppi. 1.painos. Helsinki: Edita Prima Oy
- Nienstedt W.; Hänninen O.; Arstila A. & Björkqvist S. 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 18. uudistettu painos. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö
- Mäkinen M.; Carpén O.; Kosma V.; Lehto V.; Paavonen T. & StenBäck F. 2012. Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim
- Sand O.; Sjaastad O.; Haug E. & Bjälle J. 2014. Ihminen, fysiologia ja anatomia. 8.-11. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy
- Suomen Bioanalytikkoliitto Ry, 2016. Kliininen histologia ja sytologia. http://www.bioanalytikkoliitto.fi/bioanalytikon_ammatti/erikoisalut/kliininen_histologia_ja_sytologia/. Viitattu 25.2.2016
- Taylor C. & Rudbeck L. 2013. Immunohistochemical staining methods. Sixth edition
- Terveydenhuollon laatuopas, Kuntaliiton verkkojulkaisu 2011. Viitattu 8.2.2016

THL, 2014. Laatu ja potilasturvallisuus. <https://www.thl.fi/fi/web/laatu-ja-potilasturvallisuus/etusivu/laadunhallinta>. Viitattu 10.4.2016

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö. <http://www.tenk.fi/htk-ohje/hyva-tieteellinen-kaytanto>. Viitattu 8.2.2016

Vierimaa H. & Laurila M. 2011. Keho, anatomia ja fysiologia. 1. – 2. painos. Helsinki: Wsoy Pro

Vilka H. 2015. Tutki ja kehitä. 4. uudistettu painos. Jyväskylä: PS-Kustannus

Voduc D.; Kenney C. & Nielsen T. 2008. Tissue microarrays in clinical oncology

3D Histech, 2016. Digital TMA Workflow. http://www.3dhistech.com/digital_tma. Viitattu 24.4.2016

Tutkimuslupa

**VARSINAIS-SUOMEN
SAIRAANHOITOPIIRI**

REKISTERITUTKIMUKSEN/ LAATUHANKKEEN
LUPAHAKEMUS 5 (6)

Vastuullisen tutkijan/laatuhankkeen luvanhakijan allekirjoitus

Allekirjoituksellani sitoudun omasta ja tietoja käsittelevän ryhmän puolesta tietojen salassapitoon ja niiden käyttöön vain lupapäätöksen ehtojen mukaisesti. Mikäli teemme tutkimusta, sitoudumme myös siihen, että tutkimuksessa noudatetaan hyvää tutkimustapaa ja tieteellistä käytäntöä ja että tutkimuksen tulokset julkaistaan viivyttämättä riippumatta siitä, ovatko ne hakijalle tai tutkimuksen rahoittajille toivottuja tai ei. Mahdolliset epäilyt hyvän tieteellisen käytännön loukkaamisesta käsitellään noudattaen Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohjetta "Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa" (www.tenk.fi).

Lomake toimitetaan liitteineen ennen puolta TurkuCRC:hen (Tyks, rakennus 9, 2. kerros).

Nimi: *Seija Kirkko-Jaakkola*
Asema/ virka: *pt. tuntiopettaja*
Toimipaikka: *Turun amk*
Osoite: *Ruuskatu 8, 20740 Turku*
Puh: *040 3550425*
Päiväys: *26.11.2015*

Allekirjoitus: *Seija Kirkko-Jaakkola*

Luovutettavia tietoja saa käyttää vain lupapäätöksen ehtojen mukaisesti. Tieteellistä tutkimusta koskevia ehtoja on soveltuvin osin noudatettava myös laatuhankkeissa.

Toimialueen, palvelualueen, tulosalueen tai liikelaitoksen TUTKIMUKSEN JA OPETUKSEN VASTUUHENKILÖN PUOLTO (koskee vain tutkimuksia)

Päätösnúmero: *YHT-15714*
Pvm: *2.12.2015*

Allekirjoitus: *Benita Palok*
Nimenselvitys: *BENITA PALOKKAINEN*

Benita Palok
Benita Palok

Toimialueen, palvelualueen, tulosalueen tai liikelaitoksen johtajan päätös tai johtajayliääkärin päätös LUPA TEHDÄ REKISTERITUTKIMUSTA / LAATUHANKETTA

Päätösnúmero: *YL-2015123*
Pvm: *4.12.2015*

Allekirjoitus: *Markku Kallio*
Nimenselvitys: *MARKKU KALLIO*