



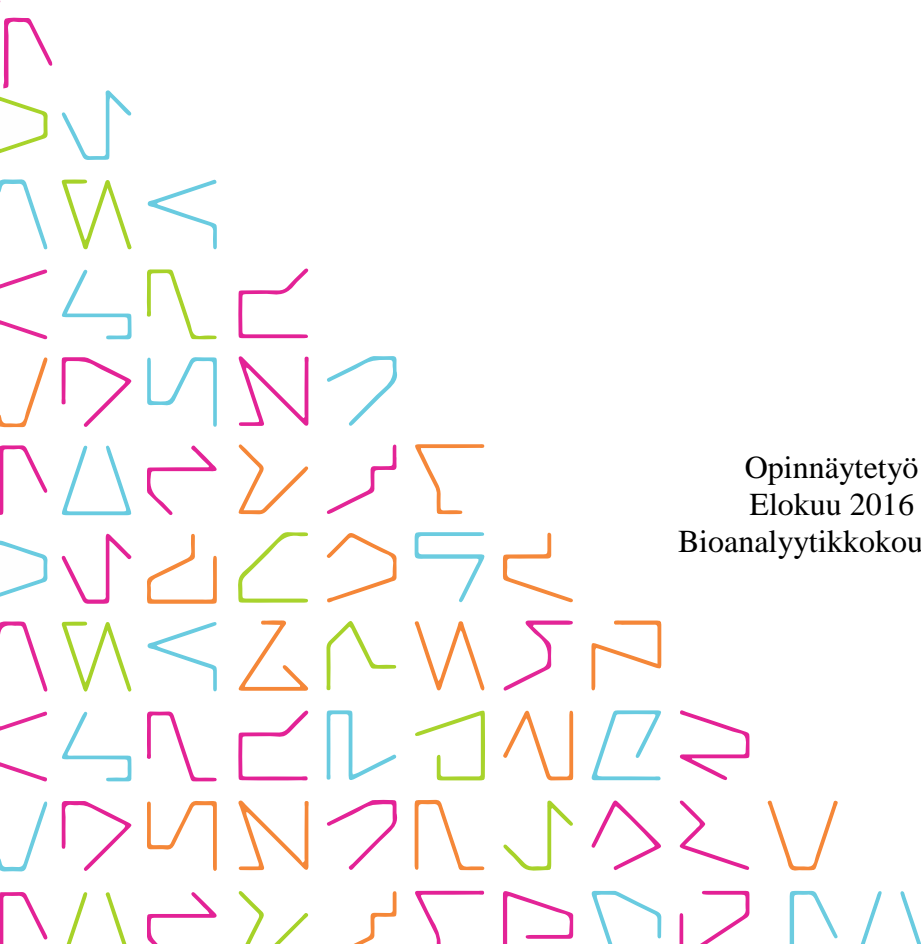
TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

IMMUNOHISTOKEMIAALLISET LIHASBIOPSIAVÄRJÄYKSET LIHASTAUTIEN DIAGNOSTIIKASSA

Sanni Nieminen

Menna Sirola

Opinnäytetyö
Elokuu 2016
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

NIEMINEN SANNI & SIROLA MENNA:
Immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjäykset lihastautien diagnostiikassa

Opinnäytetyö 51 sivua
Elokuu 2016

Lihastaudit ovat pääosin geneettisiä sairauksia, joiden tyypillisimpiä oireita ovat luustolihas kivuton heikkous ja surkastuminen. Tällä hetkellä lihastauteja tunnetaan yli 800, joiden diagnostiikka on useimmiten monivaiheinen ja pitkäkestoinen prosessi. Yksi keskeisimmistä lihastautien tutkimusmenetelmistä on lihasbiopsiasta tehtävät immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjäykset. Opinnäytetyön aiheena oli Immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjäykset lihastautien diagnostiikassa. Aihe saatiin Tampereen yliopistolta, Lihastautien tutkimuskeskuksen neuromuskulaaritautilien molekyylipatologian laboratoriolta (NMP-laboratorio).

Opinnäytetyön tarkoituksena oli laatia sähköisessä muodossa oleva kuvakansio tutkimuskeskuksessa käytössä olevista immunohistokemiallisista lihasbiopsiavärjäyksistä. Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda helppokäyttöinen ja käytännönläheinen kuvakansio toimeksiantajan käyttöön, jonka avulla pyritään ylläpitämään värjäystulosten laatua jokapäiväisessä työssä. Opinnäytetyön tehtävinä oli kuvata luustolihasan anatominen ja histologinen rakenne, kuvata lihastautien diagnostiikka ja laatia kuvakansio tutkimuskeskuksessa käytössä olevista immunohistokemiallisista lihasbiopsiavärjäyksistä.

Opinnäytetyö toteutettiin toiminnallisena opinnäytetyönä. Tuotoksesta tuli powerpoint-muotoon toteutettu 44 diainen kuvakansio, jossa on esiteltynä yhteensä 42 eri immunohistokemiallista värjäystä. Jokainen värjäys on esitetty omalla diallaan. Värjäyksestä on kerrottu värjäyksen nimi, vasta-aineen valmistaja ja värjäyksessä käytetty vasta-ainekonsentraatio. Jokaisesta värjäyksestä on esitetty kaksi kuvaa sekä normaalikontrolli että patologinen näyte. Lisäksi jokaisesta värjäyksestä on ilmoitettu tieto siitä, missä värjättävän proteiinin pitäisi sijaita lihassolussa ja/tai proteiinin tehtävä. Kuvakansion ensimmäinen dia on kansilehti ja viimeinen dia sisältää kuvakansion lähdeluettelon. Toimeksiantajalla oli tarve kuvakansiolle, sillä toimeksiantajan käytössä on kymmeniä immunohistokemiallisia värjäyksiä, joista osa on harvoin käytettyjä. Kuvakansiosta pystyy helposti tarkistamaan miltä värjäysten kuuluisi näyttää. Kuvakansio palvelee myös uusien työntekijöiden ja opiskelijoiden perehdytyksessä.

Opinnäytetyö käsittelee luustolihasan anatomiaa ja histologiaa, lihastauteja ja niiden diagnostiikkaa, opinnäytetyöprosessia sekä immunohistokemiallisia lihasbiopsiavärjäyksiä. Kuvakansiosta tuli toimeksiantajan toiveiden ja tarpeiden mukainen. Jatkotutkimusaiheeksi nousi värjäystuloksiin vaikuttavien artefaktojen kartoitus ja keinot niiden vähentämiseksi.

Asiasanat: immunohistokemia, lihasbiopsia, jääleike, lihastaudit

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

NIEMINEN SANNI & SIROLA MENNA:

Immunohistochemical Staining Methods of Muscle Biopsy in Diagnosis of Muscular Disorders

Bachelor's thesis 51 pages

August 2016

Muscular diseases are most commonly inherital disorders that cause progressive atrophy and weakness in skeletal muscle. There are more than 800 known neuromuscular diseases these days and the diagnosis of each one can be a long process entailing various medical examinations. One of the most important research method is immunohistochemical staining of muscle biopsy sample.

The purpose of this study is to design an illustrated folder in digital form containing images of the immunohistochemical stains that are used in Tampere Neuromuscular Research Center. The folder is used to evaluate the quality of the stains and for orientation of new employees and students.

The folder is presented as a powerpoint show consisting of 44 individual slides. There are 42 different stains presented in the folder. Each stain has the following information reported on the slide; the name of the stain, the antibody manufacturer and the antibody dilution used in the stain. There are two images of each stain; healthy tissue- control and a pathological sample. Also the location of the protein in the muscle cell is reported on each slide. Our thesis also contains information of anatomy and histology of skeletal muscle, muscular disorders and immunohistochemical staining methods.

Key words: immunohistochemistry, muscle biopsy, frozen section, muscular disorders

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT	8
3	LIHASKUDOS	9
	3.1 Luustolihas.....	9
	3.2 Lihassytyypit.....	12
	3.3 Lihassyyn proteiinit	14
4	LIHASTAUDIT JA NIIDEN DIAGNOSTIIKKA	16
	4.1 Lihastautien luokittelu	17
	4.2 Lihastautien diagnostiikka	18
	4.2.1 Alkuvaiheen laboratoriotutkimukset.....	19
	4.2.2 Jatkotutkimukset	19
	4.3 Lihasbiopsia.....	20
	4.3.1 Lihasbiopsian jäädyttäminen.....	21
	4.3.2 Jääleikkeiden valmistaminen	24
	4.3.3 Perusvärjäyssarja.....	25
5	IMMUNOHISTOKEMIAALLISET VÄRJÄYKSET	26
	5.1 Immunohistokemian perusteet.....	26
	5.2 Immunohistokemiaalliset värjäysmenetelmät	27
	5.3 VENTANA BenchMark GX värjäysautomaatti	29
	5.3.1 Ventanan värjäysprotokolla	30
	5.3.2 Perussarjan immunohistokemiaalliset värjäykset	32
	5.4 Laatu immunohistokemiassa.....	34
6	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	36
7	PROSESSIN KUVAUS	37
	7.1 Toiminnallisen osuuden toteutus	37
	7.1.1 Värjäysten valmistelu.....	37
	7.1.2 Ventana- värjäysautomaatin käyttö.....	39
	7.1.3 Värjäysten kuvaus ja kuvien kokoaminen kansiksi	40
	7.1.4 Kuvakansion viimeistely.....	40
	7.2 Tuotos	43
8	POHDINTA.....	45
	LÄHTEET.....	47

ERITYISSANASTO

aggrekaatio	ryhmittyminen, kasautuminen, kokkaroituminen
akkumulaatio	kasautuminen
autofagosomi	solunsisäinen kalvon ympäröimä rakkula, jossa on solun omaa tuhoutuvaa materiaalia
C-terminaalinen osa	dystrofiini- proteiini voidaan jakaa kolmeen osaan, joista solukalvon proteiinikompleksiin liittyy C-terminaalinen
JDM	Juveneeliin dermatomyosiitti eli nuoruusiän dermatomyosiitti, joka kuuluu autoimmuunitauteihin, yhden tyyppinen lihastauti
kaperoni	proteiini, joka sitoutuu polypeptidiketjuihin estäen niiden aggrekoitumista, kaperonit avustavat proteiinien laskostumista ja monialayksikköproteiinien kokoontumisessa oikeaan rakenteeseensa
N-terminaalinen osa	dystrofiini- proteiinin aktiiniin kiinnittyvä osa
perinukleaaritila	tumaa ympäröivien kahden kaksoislipidikalvon (tumakotelo), väliin jäävä tila
regeneraatio	kudoksen korjautuminen
proksimaalinen	läheinen, lähempänä keskustaa sijaitseva
ROD-domain	dystrofiini- proteiinin keskimäinen osa
sarkoplasminen retikulum	lihassolun solulimakalvosto

1 JOHDANTO

Lihastaudit ovat pääosin geneettisiä sairauksia, jotka aiheuttavat muun muassa luustoli hasten etenevää heikkenemistä ja surkastumista. Suomessa on tällä hetkellä yli 10 000 lihastautia sairastavaa potilasta. Lihastaudit jaetaan yli 800 eri tautimuotoon, joista yleisimmät Suomessa ovat tyyppin 1 ja 2 myotoniset dystrofiat sekä tibiaalinen dystrofia. (Jokela & Udd 2014, 2969.) Merkittävä osa lihastautien diagnostiikkaa ja tutkimusta ovat lihasbiopsiasta eli lihaskoepalasta tehtävät erilaiset immunohistokemialliset värjäykset, joiden avulla voidaan osoittaa esimerkiksi virheellinen tai puuttuva proteiini lihaskudoksesta (Isohanni & Pihko 2014, 175-176).

Lihastautien erityisdiagnostiikka on valtakunnallisesti keskitetty Tampereen yliopiston Lihastautien tutkimuskeskukseen, jonka palveluihin kuuluvat potilaiden kliiniset arvioinnit, lihasbiopsian tutkimukset, DNA- tutkimukset, neurofysiologiset erikoistutkimukset, lihasten rasiuskokeet ja kuvantamistutkimukset. Lihasbiopsian tutkimukset, mukaan lukien immunohistokemialliset värjäykset, tehdään tutkimuskeskukseen kuuluvassa neuro-muskulaaritautien molekyylipatologian laboratoriossa eli NMP-laboratoriossa. (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2016.)

Immunohistokemia on menetelmä, jonka avulla voidaan tunnistaa vasta-aineiden kohderakenteita kudoksessa spesifisesti. Vasta-aineen kiinnittyminen kohderakenteeseensa voidaan havaita esimerkiksi vasta-aineeseen liitetyn entsyymileiman avulla. Entsyymileima voi olla konjugoituna joko primaari- (suora menetelmä) tai sekundaarivasta-aineeseen (epäsuora menetelmä). Menetelmässä käytetään hyväksi kemiallista reaktiota, jossa entsyymileiman hapettama kromogeeni muuttuu värilliseksi lopputuotteeksi, jolloin reaktio voidaan havaita valomikroskoopissa. (Carson & Hladik 2009, 283; Renshaw 2007, 1, 34; Suvarna, Layton & Bancroft 2013, 382-385.)

Opinnäytetyömme on toiminnallinen ja sen tarkoituksena on laatia tutkimuskeskuksen käyttöön kuvakansio immunohistokemiallisista lihasbiopsiavärjäyksistä. Värjäyksillä tutkitaan ja diagnosoidaan lihastauteja tutkimuskeskuksessa. Kuvakansion tavoitteena on ylläpitää tutkimuskeskuksessa tehtävien värjäysten toistettavuutta ja tätä kautta ylläpitää niiden laatua. Kuvakansio palvelee tutkimuskeskuksen bioanalyttikkoja, laboratorioanalyttikkoja ja solubiologia käytännön työssä sekä on apuna uusien työntekijöiden ja

opiskelijoiden perehdytyksessä. Kuvakansio on toteutettu powerpoint- muotoon, jotta siihen voi tarvittaessa lisätä uusia kuvia värjäyksistä jälkeempään. Kuvakansiossa on esitetty myös jokaisen värjäyksen värjäyskonsentraatio ja värjättävän proteiinin sijainti lihassolussa tulkinnan helpottamiseksi.

Valitsimme aiheen, koska halusimme perehtyä immunohistokemiallisiin menetelmiin tarkemmin ja syventää tietämystämme lihastautien diagnostiikasta. Halusimme myös tehdä toiminnallisen opinnäytetyön, jonka aihe on työelämästä lähtöisin. Opinnäytetyön aihe on tärkeä, sillä immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjäykset ovat keskeinen osa lihastautien diagnostiikkaa (Isohanni & Pihko 2014, 175).

2 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on laatia kuvakansio Tampereen yliopiston Lihastautien tutkimuskeskuksessa käytössä olevista immunohistokemiallisista lihasbiopsiavärjäyksistä. Kuvakansio tuotetaan sähköiseen muotoon toimeksiantajan toiveesta, jotta se on jatkossa muokattavissa. Kuvakansio on tarkoitettu tutkimuskeskuksen bioanalytiikoiden, laboratorioanalytiikoiden, solubiologien ja opiskelijoiden käyttöön sekä on apuna uusien työntekijöiden perehdytyksessä.

Opinnäytetyön tavoitteena on luoda helppokäyttöinen ja käytännönläheinen tukimateriaali toimeksiantajan käyttöön. Kuvakansion avulla pyritään ylläpitämään värjäystulosten laatua jokapäiväisessä työssä. Kuvakansion tavoitteena on myös auttaa seuraamaan värjäystulosten toistettavuutta, mikä siten osaltaan ylläpitää laatua. Värjäyksiä tekevä henkilö voi helposti tarkistaa kuvakansiosta onko värjäys onnistunut.

Opinnäytetyön tehtävänä on:

1. Kuvata luustolihasan anatominen ja histologinen rakenne.
2. Kuvata lihastautien diagnostiikka.
3. Laatia kuvakansio tutkimuskeskuksessa käytössä olevista immunohistokemiallisista lihasbiopsiavärjäyksistä

3 LIHASKUDOS

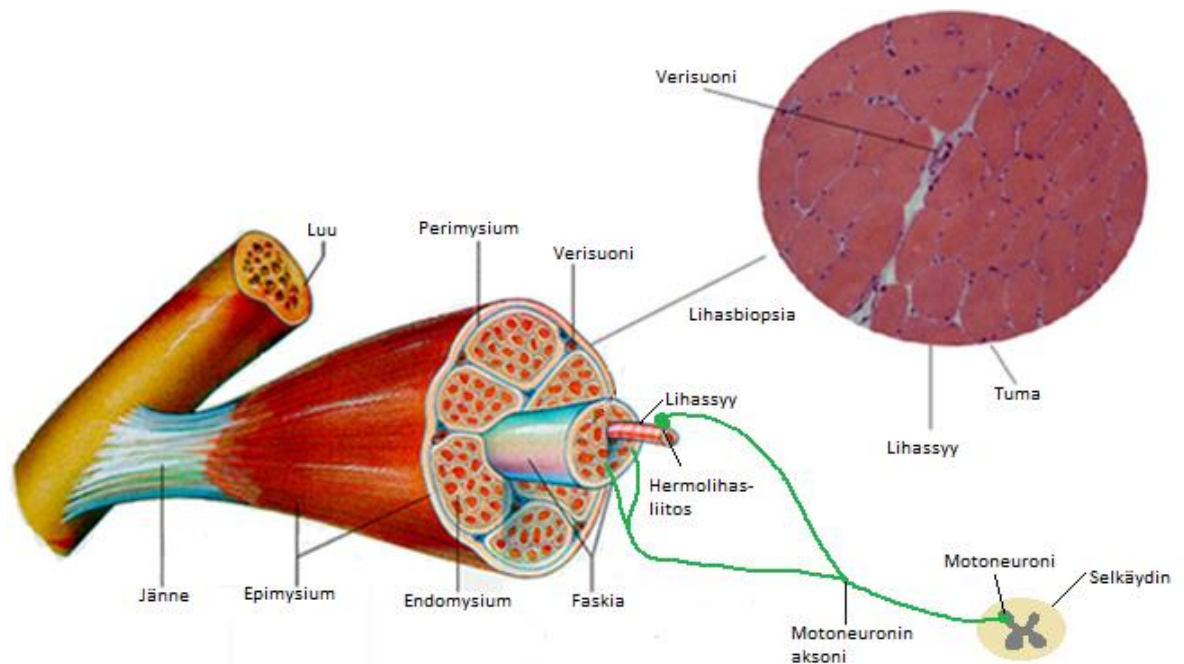
Lihakset muodostavat noin puolet ihmisen kehon painosta. Lihakset osallistuvat kehon osien liikuttamiseen, vartalon asennon ylläpitoon, ruumiinaukkojen toiminnan säätelyyn, ruuansulatuskanavan ja muiden putkimaisten rakenteiden peristaltiikan tuottamiseen, vatsaontelon elinten tukemiseen ja suojaamiseen, verenkierron säätelyyn sekä lämmöntuotantoon. (Leppäluoto ym. 2013, 93; Sand, Sjaastad, Haug & Bjålie 2011, 237.) Lihaskudos jaetaan rakenteensa ja toimintansa perusteella kolmeen päätyyppiin: luustolihakseen, sileälihakseen ja sydänlihakseen. Suurin osa luustolihaksista on jänteiden avulla kiinni luissa. Sileää lihasta esiintyy onttojen elinten ja putkirakenteiden seinämissä, kuten ruuansulatuskanavan, virtsarakon ja verisuonten seinämissä. Sydänlihasta taas esiintyy vain sydämessä. (Pocock, Richards & Richards 2013, 117-118, 131; Sand ym. 2011, 236.) Luustolihassoluissa ja sydänlihassoluissa supistumiskykyiset valkuaisaineet ovat järjestäytyneet muodostamaan poikkijuovaisen rakenteen lihakseen, toisin kuin sileässä lihaksessa. Jokainen yksittäinen luustolihassolu tarvitsee aina supistumiskäskyn hermosolulta, kun taas sydänlihassolut ja sileälihassolut voivat supistua autonomisesti ilman hermoyhteyksiä. (Leppäluoto ym. 2013, 93.) Tässä opinnäytetyössä keskitytään tarkastelemaan luustolihaksia.

3.1 Luustolihas

Luustolihakset koostuvat luustolihassoluista eli luustolihassyistä, sidekudoksesta, verisuonista ja hermoista. Luustolihassyit ovat kapeita ja pitkiä sylinterimäisiä monitumaisia soluja, joissa useat lihassyit ovat sulautuneet yhteen jo sikiökaudella. Siksi yhdessä luustolihassyssä onkin useita tumia, jotka sijaitsevat aivan solukalvon eli sarkolemman alla. (Leppäluoto ym. 2013, 94; Sand ym. 2011, 236.) Aikuisella yhden luustolihassyyn halkaisija on 0,05-0,15 millimetriä ja pituus voi vaihdella muutamista millimetreistä kymmeneen senttimetriin, mutta syyt eivät ole koskaan yhtä pitkiä kuin itse lihas (Sandström & Ahonen 2011, 95). Jokainen lihassy on liittynyt yhteen motoriseen yksikköön, joka koostuu yhdestä haarautuvasta liikehermosolusta eli alfa-motoneuronista ja sen hermotamista lihassyistä. Liikehermosolun aksonipäätteen ja luustolihassyyn välistä liitosta

kutsutaan hermo-lihasliitokseksi. Aksonia pitkin kulkeva aktiopotentiaali kulkee lihassyyn sarkolemmalle ja sieltä monien vaiheiden kautta syvemmälle lihassyhyyn ja lopulta lihas supistuu. (Leppäluoto ym. 2013, 98-99; Sand ym. 2011, 241-242.)

Jokaista yksittäistä lihassyttä ympäröi sarkolemma, jonka ympärillä on ohut sidekudoskalvo eli endomysium. Lihassyt muodostavat lihassykimppuja, joita ympäröi paksumpi sidekudoskalvo eli perimysium. Yksittäinen lihas muodostuu useista tällaisista lihassykimpuista, joiden ympärillä on tukeva sidekudoskalvo eli epimysium. Epimysiumin ympärillä on vielä peitinkalvo eli faskia. (Leppäluoto ym. 2013, 94; Pocock ym. 2013, 118-117.) Näiden kaikkien kalvojen kollageenisyyt yhtyvät lihaksen päissä suoraan jänteisiin, jotka kiinnittyvät edelleen luihin (Sand ym. 2011, 237). Kuvassa 1 on esitetty edellä kuvatut luustolihasan anatomiset ja histologiset rakenteet. Lihاسبiopsian hematoksyliini-eosiini-värijäyksestä (HE- värijäys) voidaan nähdä yksittäiset lihassyt, verisuoni, jonka ympärillä on sileää lihaskudosta, soluväliainetta (lihassyiden välissä) ja lihassyiden useat tumat (Dubowitz & Sewry 2007, 21, 42-45).

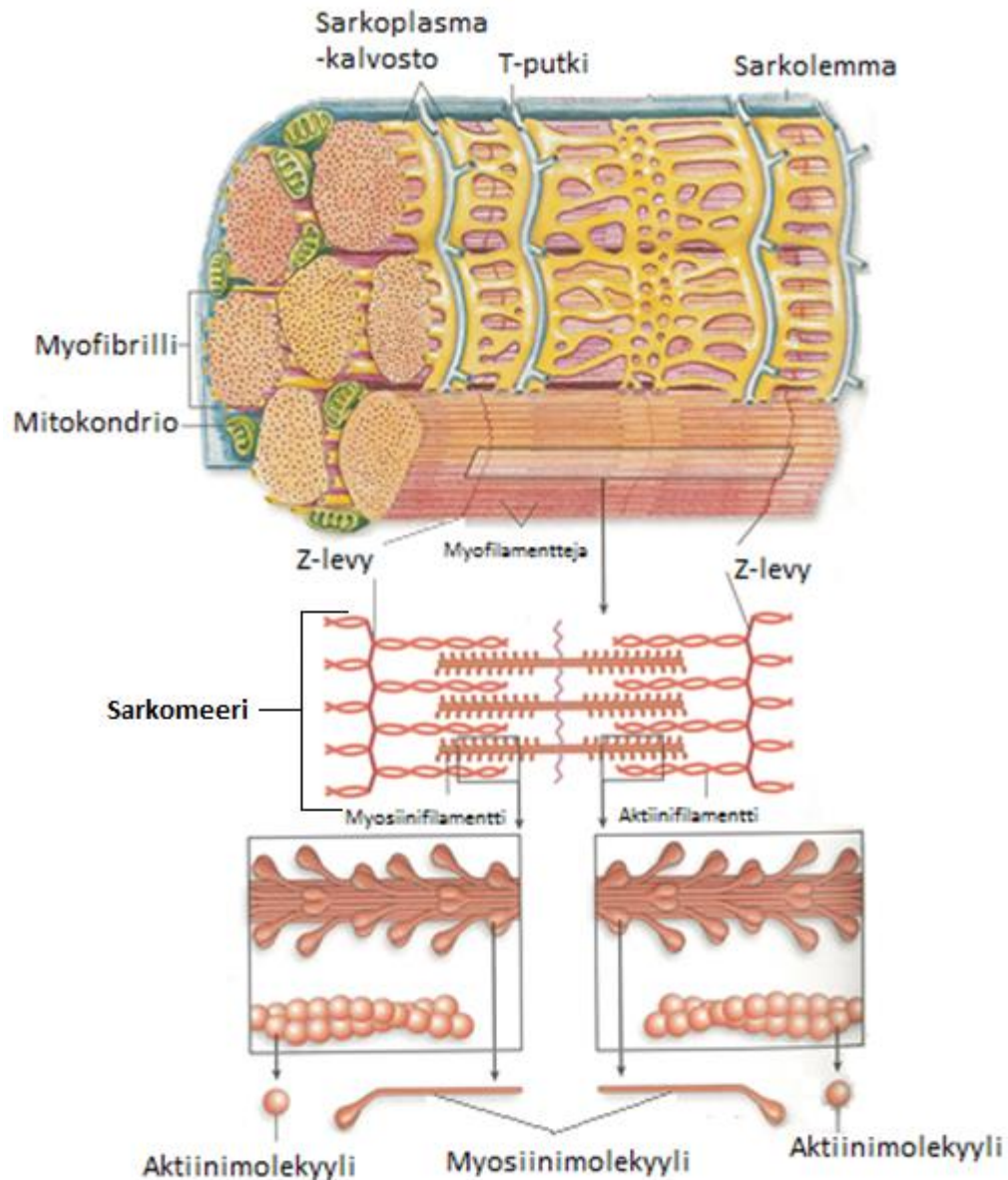


KUVA 1. Luustolihasan anatominen- ja histologinen rakenne (anatominen rakenne muokailen Isohanni & Pihko 2014, 172; The Benjamin/Cummings Publishing Company) (Histologinen kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

Yksittäiset lihassyöt muodostuvat syyn pituusakselin kanssa yhdensuuntaisesti kulkevista pienistä toiminnallisista yksiköistä, myofibrilleistä, jotka kulkevat lihassyyn päästä päähän. Myofibrillit ovat noin yhden mikrometrin paksuisia ja niitä on yhdessä 100 mikrometrin paksuisessa ja yhden senttimetrin pituisessa lihassyssä noin 8000 kappaletta. Myofibrillit sisältävät vielä pienempiä osarakenteita, myofilamentteja, jotka koostuvat säännöllisesti järjestäytyneistä aktiini- ja myosiiniproteiineista. (Sandström & Ahonen 2011, 97.) Myofilamenttien säännöllisesti järjestäytyneitä rakenteita kutsutaan sarkomeereiksi. Yksittäinen sarkomeeri koostuu kahdesta ryhmästä aktiinifilamentteja, ja kummankin ryhmän toinen pää on kiinnittynyt valkuaisaineverkkoon eli Z-levyyn, joka erottaa sarkomeerit toisistaan. Myosiinifilamentit sijaitsevat sarkomeerin keskellä aktiinifilamenttien lomassa niin, että myosiini- ja aktiinifilamenttien päät ovat toistensa lomassa. Jokaisen sarkomeerin myosiinifilamentteja yhdistää toisiinsa proteiiniverkko. (Sand ym. 2011, 238-239.) Jokaisessa myofibrillissä on noin 900 aktiinifilamenttia ja 450 myosiinifilamenttia, jotka voidaan paikantaa tuki- ja säätelijäproteiineineen sarkomeereiksi. Yhdessä myofibrillissä on keskimäärin 4500 sarkomeeria. (Sandström & Ahonen 2011, 97.)

Myosiinifilamentit muodostuvat useista sauvamaisista myosiinimolekyyleistä. Näissä golfmailalta näyttävissä molekyyleissä on taivutetun rungon päässä kaksinkertainen, paksumpi väkänen. Nämä väkäset nousevat myosiinifilamenttien muodostamalta pinnalta kohti aktiinifilamentteja. Aktiinifilamentit koostuvat pallomaisista aktiinimolekyyleistä, jotka ovat järjestäytyneet kierteiseksi kaksoisketjuksi. Aktiinimolekyyleissä on myosiinimolekyylien väkäsille sopivia sitoutumiskohtia, joiden ansiosta myosiinimolekyylien väkäset pystyvät sitoutumaan aktiinimolekyyleihin. Näihin sidoksiin perustuu kaikkien lihassyiden supistuminen. (Sand ym. 2011, 239.)

Jokaista myofibrillia ympäröi lihassyiden endoplasmakalvosto eli sarkoplasmakalvosto, jonka lomassa sijaitsevat useat mitokondriot. Sarkoplasmakalvoston yhteydessä on poikittain kulkevia haaroittuneita putkimaisia syvennyksiä eli T-putkia, jotka sijaitsevat myofibrillin ympärillä Z-levyjen kummallakin puolella, tiiviisti kiinni sarkoplasmakalvostossa. Hermo-lihasliitoksesta tuleva aktiopotentiaali leviää sarkolemmaa pitkin T-putkistoon, josta se pääsee nopeasti syyn syvempiin osiin. Monien vaiheiden kautta lihassupistus etenee sarkomeereihin, jolloin aktiini- ja myosiinifilamentit liukuvat toistensa lomassa ja lihas supistuu. (Sand ym. 2011, 239-241.) Kuvassa 2 on esitetty edellä kuvatut sarkomeerin rakenteet.



KUVA 2. Sarkomeerin rakenne (mukaillen Sand ym. 2011, 238)

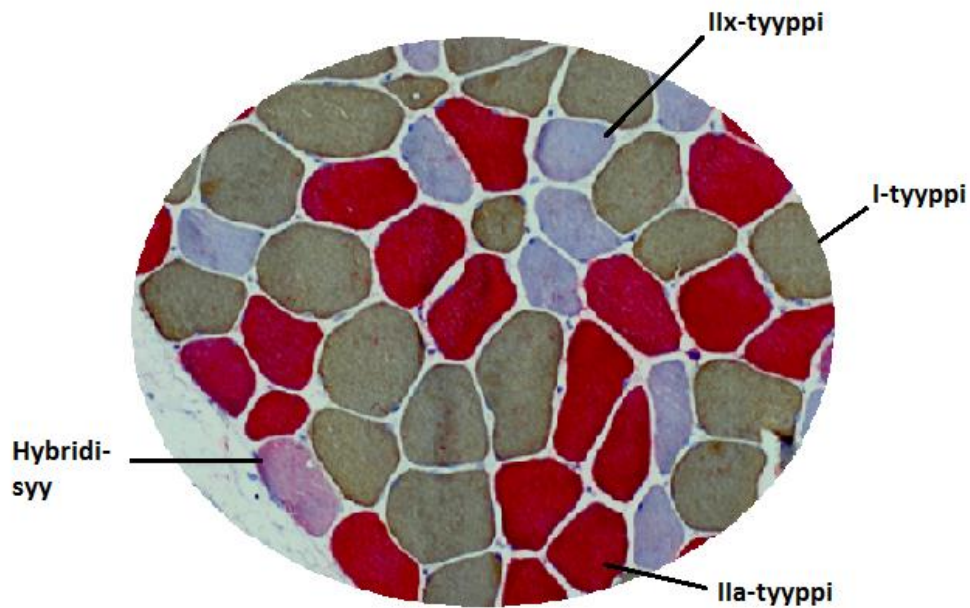
3.2 Lihassytyypit

Kaikki lihassytyypit eivät ole samanlaisia edes samassa lihaksessa, vaan ne voidaan jakaa erilaisiin ryhmiin syiden fysiologisten ja biokemiallisten ominaisuuksien perusteella. Suurin osa luustolihasista onkin yhdistelmä eri syytyypeistä. (Dubowitz & Sewry 2007, 47.) Lihassyiden ero huomattiin ensimmäisen kerran vuonna 1873, jonka jälkeen syitä on jaoteltu monin tavoin eri aikakausina. Tutkijat ovat jaotelleet lihassyitä muun muassa nii-

den morfologisten ja fysiologisten ominaisuuksien perusteella. Syiden jaottelu on muuttunut eri aikakausina laboratoriomenetelmien kehittyessä. Tänä päivänä lihassyiden jaottelu perustuu joko niiden voimantuotto-ominaisuuksiin tai supistuvien proteiinien, lähinnä myosiinin, isomeerien eroavaisuuksiin. Vaikka lihassyitä on jaoteltu monin tavoin, ja niitä on nimetty usealla eri tavalla, havaitaan kaikkien jaotteluiden päätyvän tiettyihin lihassyityyppeihin, hitaisiin ja nopeisiin. (Kauranen 2014, 77.) Tässä opinnäytetyössä lihassyityyppejä tarkastellaan immunohistokemian kannalta.

Tyypin I syitä kutsutaan hitaiksi lihassyiksi ja tyypin II syitä nopeiksi lihassyiksi. Hitaat lihassyit ovat väriltään punaisempia kuin nopeat lihassyit ja niiden metaboliaa tapahtuu pitkälti aerobisessa tilassa, koska niissä on enemmän oksidatiivisia entsyymejä kuin nopeissa lihassyissä. Nopeiden lihassyiden aineenvaihdunta perustuukin pitkälti anaerobisessa tilassa tapahtuvaan glykolyysireaktioon. Hitaat lihassyit supistuvat hitaammin ja niiden voimantuotto-ominaisuudet ovat matalammat kuin nopeilla lihassyillä. Hitailta lihassyillä on paremmat kestävyysominaisuudet, koska ne sisältävät runsaasti mitokondrioita ja myoglobiinia. Niillä on myös tiheä kapillaariverkosto. Hitaiden lihassyiden avulla tehdään pitkäkestoiset ja matalatehoiset lihastyöt. Niitä esiintyy erityisen paljon toonisissa lihaksissa, jotka toimivat usein vartalon asentoa ylläpitävinä ja painovoimaa vastustavina lihaksina. Nopeita lihassyitä esiintyy vastaavasti faasisissa lihaksissa, jotka ovat motorisia ja asentoa muuttavia lihaksia. (Kauranen 2014, 78-79.)

Nopeat lihassyit on jaoteltu edelleen alaluokkiin; Iia, Iix ja hybridisyit. Iia-syillä on kohdalaiset oksidatiiviset kestävyysominaisuudet, mutta Iix-syyt ovat puhtaasti glykolyyttisiä väsyen erittäin nopeasti. Iic-tyypin lihassyit ovat epäkypsiä lihassyitä, joita tavataan pääasiassa vastasyntyneillä. Lihassyitä voidaan värjätä immunohistokemiallisesti esimerkiksi myosiinin kaksoisvärjäyksellä (myosiini slow+fastA4) (kuva 3), joka perustuu lihaksen supistuvien filamenttiproteiinien myosiinin ja sen kahden raskaan- ja neljän kevyetjun tunnistukseen. (Kauranen. 2014, 79-83.) Värjäyksellä pystytään erottamaan hitaat- (I) ja nopeat lihassyit (Iia ja Iix) sekä hybridisyit, jotka ovat sekoitus Iia- ja Iix-syitä. Hitaat lihassyit (I) näkyvät ruskeina, nopeat Iia-syyt punaisina ja ultranopeat glykolyyttiset Iix-syyt näkyvät sinisinä. Roosin väriset syyt ovat Iia- ja Iix-hybridisyitä, jotka ovat osa normaalivariaatiota. (Palmio & Udd 2015; Pocock ym. 2013, 124.)



KUVA 3. Myosiinin kaksoisvärjäys (myosiini slow+fastA4), 20-kertainen normaalikontrolli aikuisen luustolihaksesta (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

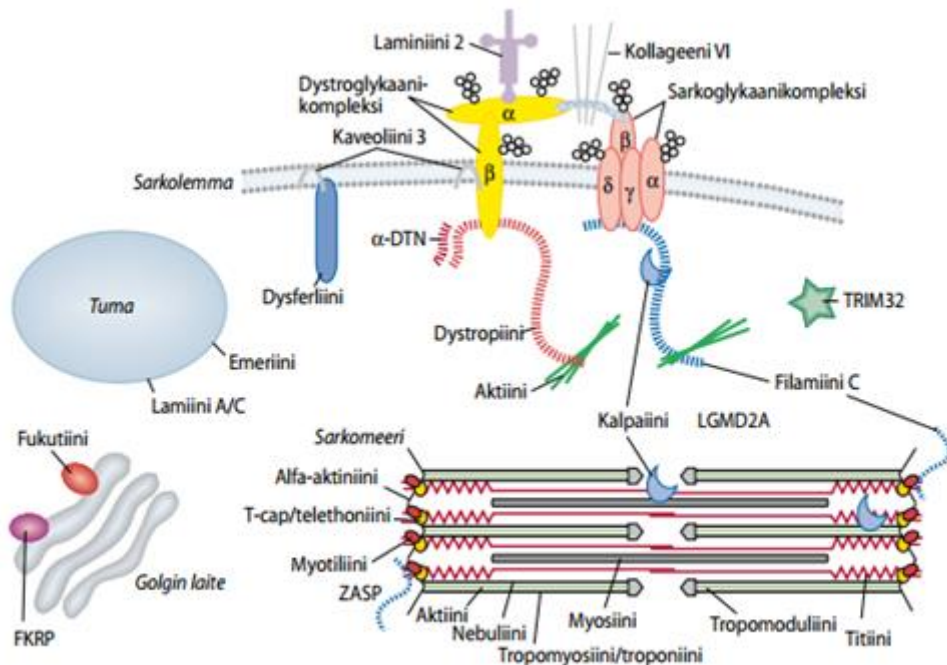
3.3 Lihassyyn proteiinit

Tämän opinnäytetyön immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjäykset perustuvat lihas-syissä paikannettaviin proteiineihin. Nämä proteiinit voivat sijaita syyn kaikissa rakenteissa, joita ovat soluväliaine, sarkolemma, sarkomeeri, golgin laite, solun sisäinen membraani, tuma, myofibrillit, hermolihasliitos ja sytoplasma (Dubowitz & Sewry 2007, 271). Lisäksi proteiinit voivat toimia myös kaperoneina esimerkiksi solun kalvorakenteissa ja tumassa (UniProtKB 2016a). Värjäysten ymmärtämisen kannalta on tärkeää tietää paikannettavien proteiinien sijainti, jotta värjäyksen tulkinta helpottuisi. Tässä osiossa esitellään muutamia proteiineja lihassyyn eri rakenteista.

Luustolihas-solun solukalvo toimii rajapintana solun ja soluväliaineen välillä. Sarkolemmalla sijaitsevat proteiinit voivat toimia esimerkiksi ionikanavina (Dysferlin) tai rakenneproteiineina, esimerkiksi α - ja β - sarkoglykaanit. Lisäksi sarkolemmalla on reseptoriproteiineja ja metabolisesti aktiivisia proteiineja. Lukuisat proteiinit, jotka ovat patologistesti merkittäviä sijaitsevat sarkolemmalla. Nämä proteiinit läpäisevät sarkolemmalla fosfolipidikalvon kummastakin päästä. Osa proteiineista on liittynyt dystrofiini-glykoproteiini-

teiniinikompleksiin (dystrophin-associated protein complex/DAP), joka yhdistää soluväliaineen sarkolemmän alapuolella sijaitsevaan aktiini-tukirakenteeseen. DAP-kompleksi koostuu proteiineista, jotka ovat: lamiini, α -dystroglykaani, β -dystroglykaani, sarkoglykaanit, dystrofiini ja NOS. (Dubowitz & Sewry 2007, 57-59, 215.) Osa näistä proteiineista voidaan jakaa vielä pienempiin osiin, joita ei käsitellä tässä opinnäytetyössä.

Tumassa sijaitsevia proteiineja ovat esimerkiksi emeriini ja lamiini A/C. Sarkomeerin proteiineja ovat esimerkiksi aktiini ja Z-levyssä sijaitsevat myotiliini ja teletoniini. (Raheem ym. 2006, 2131.) Sytoplasmassa sijaitsevia proteiineja ovat esimerkiksi Transitional endoplasmic reticulum ATPaasi (VCP) (UniProtKB 2016d) ja LC3B (LC3B (D11) XP® Rabbit mAb 2015). Kaperonina toimii esimerkiksi α -B-Crystallin (UniProtKB 2016a). Lisäksi on myös olemassa muita proteiineja, joista vain osa on esitelty tässä opinnäytetyössä, esimerkiksi värjäämämme Myosin Heavy Chain Neonatal (MHCn) on sytoplasmassa sijaitseva proteiini, joka häviää normaalisti sikiökauden jälkeen (Novocstra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Myosin Heavy Chain (developmental)). Golgin laitteen proteiineja ei ole käsitelty tässä työssä. Kuvassa 4 on esitetty osa edellä kuvatuista rakenteista.



KUVA 4. Lihassyyn proteiinit (mukailtu Raheem ym. 2006, 2132)

4 LIHASTAUDIT JA NIIDEN DIAGNOSTIIKKA

Lihastaudit eli lihassairaudet ovat yleisnimitys harvinaisille, usein geeniperäisille sairauksille, joissa on kysymys lihasten ja lihasten ja hermojen yhteistoiminnan häiriöstä (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2016). Näitä sairauksia käsittelevässä kirjallisuudessa saatetaan käyttää myös termejä myopatia ja neuromuskulaaritauti. Sanalla myopatia tarkoitetaan itse lihaskudoksen tautia eli primaarista lihastautia (Isohanni & Pihko 2014, 173), kun taas neuromuskulaaritaudilla tarkoitetaan hermo-lihasperäisiä tauteja (Lihastautiliitto ry, b). Tässä työssä lihastaukeista yleisesti puhuttaessa tarkoitetaan kaikkia niitä tauteja, jotka johtuvat lihassyyn rakenteen, hermo-lihasliitoksen tai ääreishermosten häiriöstä.

Suurin osa (yli 90 %) lihastaukeista on perinnöllisiä (Palmio & Udd 2015). Ne voivat periä autosomissa vallitsevasti tai peittyvästi, X-kromosomaalisesti tai maternaalisesti (Isohanni & Pihko 2014, 173). Vuonna 2010 tiedettiin olevan yli kaksisataa geeniä, joiden virheet aiheuttavat erilaisia lihastaukeja ja uusia löydetään vuodessa noin kymmenen lisää. Tällä hetkellä useiden tautien geenisytyt ovat vielä työn alla. Vuosittain ilmenee noin kaksikymmentä uutta tautitapausta, jotka voisivat olla uusia lihastaukeja, mutta niiden taustoja ei ole vielä pystytty selvittämään. (Collin 2010.)

Taudista ja tautimuodosta riippuen, tauti voi ilmetä jo vastasyntyneellä, myöhemmin lapsuudessa, nuoruudessa tai aikuisuudessa (Lihastautiliitto ry, b). Lihastautien tyypillisimpiä oireita ovat luustolihasen lihasheikkous, poikkeava lihasten väsyminen, lihasjäykkyys eli myotonia sekä lihaskrampit. Joissakin lihastaukeissa saattaa myös esiintyä hengitys- ja sydänlihaksen vaurion merkkejä. (Palmio & Udd 2015.) Oireina voi myös olla esimerkiksi tuntouutokset tai hypertrofiset eli suurentuneet lihakset. Pikkulasten lihastaudin yleinen oire on lihasvoiman heikkoudesta johtuva viiveinen motorinen kehitys (Isohanni & Pihko 2014, 172-173.) Sama diagnoosi saattaa myös vaihdella vaikeusasteeltaan jopa saman perheen välillä lievältä toimintahäiriöstä vaikeavammaisuuteen. Tavallisesti lihastaudit etenevät hitaasti, eivätkä vaikuta elinikään, mutta on myös olemassa nopeasti eteneviä lihastaukeja, jotka saattavat lyhentää elinikään huomattavasti. Lihastaudit eivät yleensä vaikuta älyllisiin tai henkisiin suorituksiin. (Lihastautiliitto ry, b.)

4.1 Lihastautien luokittelu

Lihastaudit luokitellaan lihasperäisiin lihastauteihin, hermo-lihasliitoksen tauteihin ja hermoperäisiin lihastauteihin. Nämä luokat jaetaan edelleen vielä tarkemmiksi alatyypiksi ja diagnooseiksi. (Kauranen 2014, 357; Lihastautiliitto ry, a.) Tautiluokitus perustuu kliiniseen kuvaan, lihasheikkouden jakaumaan, periytymistapaan ja lihasbiopsiassa ilmeneviin histopatologisiin löydöksiin. Molekyyli-genetiikan kehityksen myötä monien perinnöllisten tautien geenivirhe on pystytty määrittämään tarkkaan viime vuosina, mikä on mullistanut lihastautien luokituksen. (Palmio & Udd 2015.)

Lihasperäisillä lihastaudeilla tarkoitetaan tauteja, joissa keskeiset oireet tulevat lihaskudoksesta ja taudin syy on lihassyssä (Kauranen 2014, 363; Palmio & Udd 2015). Usein geenivirhe aiheuttaa muutoksia lihassyyn proteiineissa (esitetty luvussa 3.3) jolloin proteiiniin tulee poikkeavuuksia tai se voi puuttua kokonaan, minkä seurauksena potilaalle aiheutuu lihastauti (Raheem ym. 2006, 2130-2136). Useat lihasperäiset lihastaudit liittyvät dystrofiini-glykoproteiinikompleksin proteiinien rakennemuutoksiin (Sillanpää ym. 2004, 397). Syynä voi myös olla ionikanavan tai lihaksen aineenvaihdunnan häiriö tai kyseessä voi olla immuunireaktion laukaisema lihastauti (Isohanni & Pihko 2014, 177). Lihasperäisiä lihastauteja ovat erilaiset lihasdystrofiat, kongenitaaliset lihasdystrofiat, kongenitaaliset myopatiat, myotoniat, myosiitit, metaboliset myopatiat ja periodiset paralyysit (Lihastautiliitto ry, b).

Lihasdystrofoissa eli lihaskudoksen ravitsemushäiriöissä geenivirhe aiheuttaa erilaisia mutaatioita lihaskudoksen rakenneproteiineissa. Kongenitaalisissa lihasdystrofoissa taudin oireet ilmenevät synnynnäisesti tai pian syntymän jälkeen. Geenimutaatiot sijaitsevat geneeissä, jotka koodaavat tyvikalvon, solun ulkoisen matriksin tai glykoproteiinien muodostumista. Kongenitaalisissa myopatioissa oireet ilmenevät myös synnynnäisesti tai pian syntymän jälkeen. Myös näille taudeille on tunnusomaista lihassyssä havaittavat rakenteelliset muutokset esimerkiksi syytyppiepäsuhta. Myotonioissa keskeinen ongelma on luustolihasien lisääntynyt lihasjänteys. Ongelmat näkyvät käytännössä vaikeutena ja hitautena rentouttaa lihaksia tahdonalaisen lihassupistuksen jälkeen. Myosiitit ovat nimensä mukaan tulehduksellisia lihastauteja, joissa luustolihaskudoksessa havaitaan tulehdusmuutoksia. Myosiitit eivät ole perinnöllisiä ja niitä pystytään hoitamaan tulehdusta lievittäväillä lääkkeillä. Metaboliset myopatiat ovat nimensä mukaan lihaskudoksen aineenvaihdunnan häiriöitä tai lihassyiden mitokondrioiden vaurioista johtuva oireyhtymä,

joissa lihassyiden energiantuotanto on häiriintynyt. Periodisissa paralyyseissä lihas voi halvaantua hetkellisesti, yleensä 1-2 tunniksi. Tautalla on mutaatio natrium-kalium-kanavia koodaavissa geeneissä, joka aiheuttaa näiden ionien aineenvaihdunnan häiriön. (Kauranen 2014, 364, 366-367, 370, 372.)

Hermo-lihasliitoksen taudeissa lihaskudos ja α -motoneuronit ovat terveet, mutta näiden välinen synapsi ei välitä impulsseja normaalilla teholla. Hermo-lihasliitoksen vajaatoiminta johtuu tavallisesti elimistön autoimmuunitoiminnasta, jollin elimistössä valmistuu tuntemattomasta syystä vasta-aineita, jotka estävät hermo-lihasliitoksen reseptoreita toimimasta optimaalisesti. Reseptoritoiminnan salpautuminen estää hermoimpulssin kemiallisen siirtymisen täydellisesti tai osittain synapsiraon yli lihakseen, ja aktiopotentiaali jää lihassyssä vajaaksi, eikä lihassupistus tapahdu optimaalisesti. (Kauranen 2014, 361.) Hermo-lihasliitoksen sairauksia ovat erilaiset myasteniat, joissa oireina ovat halvausmainen lihasheikkous ja väsyvyys (Lihastuliitto ry, b).

Hermoperäisistä lihastaudeista on kyse silloin, kun lihaskudoksen tai lihassyyn hermotus on epätäydellistä tai puuttuu kokonaan. Hermoperäisessä lihastaudissa primaarisyy lihasvoiman laskuun on lihasta hermottavissa ylemmissä tai alemmissä motoneuroneissa. (Kauranen 2014, 358.) Hermoperäisiä lihastauteja ovat polyneuropatiat eli periytyvät ääreishermostosairaudet, spinaaliset atrofiat eli selkäydinperäiset hermo-lihastaudit ja motoneuronitaudit eli liikehermojen ja –solujen taudit (Lihastuliitto ry, a).

4.2 Lihastautien diagnostiikka

Lihastautien diagnostiikka alkaa yleensä perusterveydenhuollossa yleislääkärin vastaanotolla (Jokela & Udd 2014, 2969). Lihastautien alkuvaiheen diagnostiikka perustuu potilaan kliiniseen arviointiin ja laboratoriotutkimuksiin (Korpela ym. 2008, 2998). Mikäli alkuvaiheen tutkimuksilla ei pystytä selvittämään potilaan oireiden aiheuttajaa, ovat jatkotutkimukset aiheellisia. Jatkotutkimuksina käytetään elektroneuromyografiaa (ENMG), kuvantamistutkimuksia ja lihasbiopsiasta tehtäviä tutkimuksia. (Jokela & Udd 2014, 2969-2970.) Lisäksi lihastautien diagnostiikassa hyödynnetään molekyyliгенеettisiä menetelmiä (Korpela ym. 2008, 2997).

4.2.1 Alkuvaiheen laboratoriotutkimukset

Ensivaiheen laboratoriotutkimuksiin kuuluu kreatiinikinaasi (S/P-CK), perusverenkuva (B-PVK), aldolaasiaktiivisuus (S-Aldol) ja lasko (B-La) (Korpela ym. 2008, 2998). Kreatiinikinaasi on lihassolujen entsyymi, jota normaalitilassa joutuu vereen vähäisiä määriä. Lihaksen vaurioituessa kreatiinikinaasia joutuu tavallista enemmän lihassoluista vereen. Lihavaurion yhteydessä kreatiinikinaasi voi nousta monisatakertaiseksi. (Eskelinen 2016; Penttilä & Pulkki 2010, 192.) Kreatiinikinaasin määrittystä plasmasta tai seerumista käytetään myös ensisijaisena tutkimuksena lihastautien poissuljennassa (Isohanni & Pihko 2014, 175). Perusverenkuva antaa yleiskäsityksen potilaan hematologisesta tilasta (Eskelinen 2016). Aldolaasi (S-Aldol) on entsyymi, joka osallistuu glukoosin pilkkoutumiseen. Aldolaasia on erityisen runsaasti lihaksistossa ja se kohoaa tietyissä lihastauksissa. (HUSLAB 2016.) Veren lasko kohoaa tulehduksellisissa lihastauksissa (Penttilä & Pulkki 2010, 192).

Muita lihastauteihin viittaavia muutoksia ovat myoglobiinin nousu seerumissa (S-Myogl) ja virtsassa (U-Myogl) sekä C-reaktiivisen proteiinin (S/P-CRP) nousu seerumissa. Myoglobiini toimii lihaskudoksessa hapen siirtäjänä energiaa vaativiin reaktioihin. Pienen molekyylikokonsa ansiosta myoglobiini pääsee helposti siirtymään vereen ja edelleen virtsaan lihavaurion seurauksena, jolloin se voi kohota monituhatkertaiseksi. Seeruminen C-reaktiivinen proteiini (CRP) kohoaa tulehduksellisissa lihastauksissa. (Penttilä & Pulkki 2010, 191-192.) Endokrinologisten syiden poissulkemiseksi määritetään myös kilpirauhasarvot, kalium-, natrium-, kalsium ja glukoosipitoisuudet verinäytteistä (Jokela & Udd 2014, 2969).

4.2.2 Jatkotutkimukset

Mikäli laboratoriotutkimusten perusteella ei voida pois sulkea lihastaudin mahdollisuutta, potilaalle tehdään ENMG-tutkimus (Jokela & Udd 2014, 2970). ENMG-tutkimus koostuu kahdesta erillisestä tutkimuksesta, lihassähkötutkimuksesta eli elektromyografiasta (EMG) ja hermoratojen sähköisestä tutkimuksesta eli elektroneuroografiasta (ENG). ENMG-tutkimuksessa mitataan luustolihas- ja niitä hermottavien perifeeristen liikehermojen sekä tuntohermojen sähköistä toimintaa. EMG-tutkimuksessa mitataan lihaksen toimintaa neulaelektrodilla sekä lepotilassa että tahdonalaisen lihasaktivaation aikana.

ENG:ssä tutkitaan sensoristen ja motoristen hermojen toimintaa mittaamalla pienten sähköimpulssien synnyttämiä vasteita. Mittaus rekisteröidään ihon pinnalle kiinnitettävien elektrodien avulla. (Vanhatalo & Soinila 2015.)

Lihasten magneettikuvausta voidaan harkita, mikäli ENMG-löydös on normaali tai jää epäspesifiseksi, mutta lihastautia kuitenkin epäillään oireiden vuoksi (Jokela & Udd 2014, 2970). Magneettikuvauksen avulla saadaan käsitys lihasatrofioista ja lihasten rasvadegeneraatioista, jotka ovat tyypillisiä joillekin lihastaudeille. Magneettikuvausta voidaan hyödyntää tautiprosessin levinneisyyden selvittämisessä ja lihasbiopsian kohdan valinnassa, minkä takia magneettikuvaus on järkevää tehdä ennen lihasbiopsianottoa. (Korpela ym. 2008, 3001.)

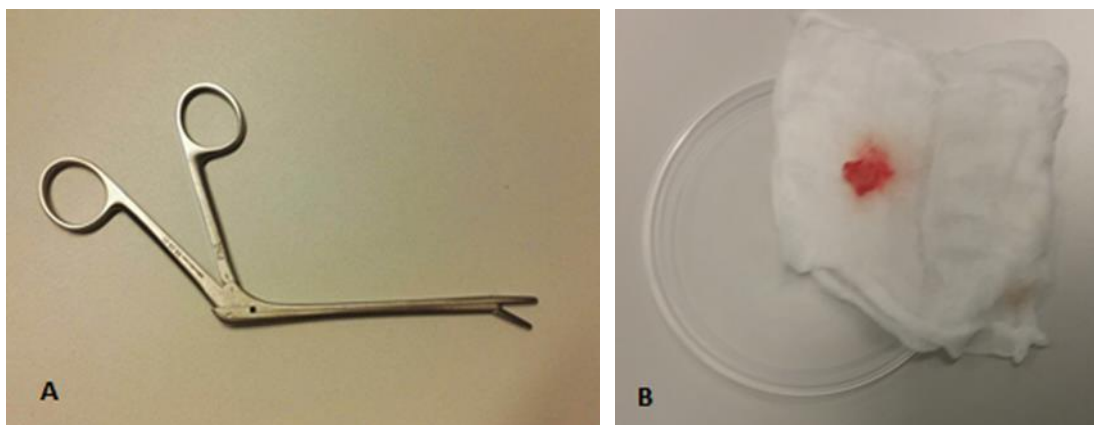
Lisäksi lihastautien selvittelyssä voidaan käyttää esimerkiksi lihasten rasituskokeita ja Western Blot- menetelmää (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2015). Lihasten rasituskokeisiin kuuluu esimerkiksi spiroergometria laktaatinäytein, jossa potilaan veren laktaattipitoisuutta seurataan rasituksen eri vaiheissa. Normaalisti veren laktaattipitoisuus nousee 3-5 kertaiseksi rasituksessa, mutta lihastaudeissa veren laktaattipitoisuudet voivat olla tavanomaisesta poikkeavia. (Hus Kuvantaminen 2013). Western blot –menetelmän avulla kvantifioidaan lihasproteiineja, sillä lihastaudeissa lihasproteiinien määrässä voi tapahtua muutoksia (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2015). Western blot- menetelmässä proteiinit ensin erotellaan kokonsa mukaisesti geelielektroforeesilla, siirretään väliaineiseen ja lopuksi värjätään niille spesifisti leimatuilla vasta-aineilla (Mahmood & Yang, 2012). Lihasbiopsiasta tehtävät histokemialliset ja immunohistokemialliset tutkimukset esitellään myöhemmin tässä työssä.

4.3 Lihasbiopsia

Lihasbiopsia voidaan ottaa joko puoliavoimena lihasbiopsiana tai avobiopsiana. Puoliavoin lihasbiopsia eroaa avobiopsiasta näytemäärän perusteella. Puoliavoin lihasbiopsia on kooltaan noin 5-6 millimetriä, kun taas avobiopsia on pituudeltaan 1,5-2 senttimetriä ja paksuudeltaan 0,5-1 senttimetriä. (LIHASBIOPSIAN LÄHETYS...) Puoliavoin lihasbiopsia otetaan polikliinisesti pääasiassa aikuisilta (TYKSLAB 2016). Lasten kohdalla taas suositetaan avobiopsiaa riittävän näytteen saamiseksi (Isohanni & Pihko 2014, 175).

Kun potilaalta on päädytty ottamaan lihasbiopsia, tulee sen ottokohta valita huolella (Dubowitz & Sewry 2007, 4). Lihasbiopsia otetaan lääkärin tekemän kliinisen tutkimuksen tai magneettikuvan perusteella valitusta lihaksesta tai biopsia voidaan ottaa ENMG-tutkimuksen yhteydessä (Jokela & Udd 2014, 2970). Näytteenottokohdaksi valitaan selvästi affisoitunut eli vaurioitunut lihas, joka ei saa kuitenkaan olla liian surkastunut (TYKSLAB 2016). Lihasbiopsia otetaan tavallisesti ulommasta reisilihaksesta, etummaisesta sääريلihaksesta tai kolmipäisestä hartialihaksesta (HUS Kuvantaminen 2010).

Lihasbiopsian otto suoritetaan potilaan ollessa makuuasennossa (HUS Kuvantaminen 2015). Aikuisten kohdalla biopsia otetaan paikallispuudutuksessa, mutta lasten kohdalla suositetaan yleensä yleisanestesiaa toimenpiteen invasiivisuuden vuoksi (Kauranen 2014, 31). Ennen puoliavoimen biopsian ottoa iho puhdistetaan ja puudutetaan, jonka jälkeen siihen tehdään noin 5-6 mm:n viilto ihon ja faskian läpi. Lihaksesta otetaan 5-6 kappaletta lihasbiopsioita konkotomilla eli alligaattoripihdeillä (kuva 5A). Lihasbiopsiat laitetaan irrottamisen jälkeen näytepurkkiin keittosuolaliuoksella kostutetussa harsotaitoksessa (kuva 5B). (LIHASBIOPSIAN LÄHETYS...) Toimenpiteen jälkeen haava suljetaan haavateipillä, joka poistetaan viikon kuluttua (HUSLAB 2010).



KUVA 5. Konkotomi (A) ja lihasbiopsia (B) (Kuva: Menna Sirola 2016)

4.3.1 Lihasbiopsian jäädyttäminen

Lihasbiopsioiden immunohistokemiallisessa värjäysprosessissa käytetään jääleiketekniikkaa, koska parafinitekniikan aiheuttama kuumuus ja fiksaatio tuhoavat kudoksen antigeenejä, mitä tarvitaan immunohistokemiallisessa värjäysprosessissa (Dubowitz & Se-

wry 2007, 11; Suvarna ym. 2013, 131, 136). Kun biopsia saapuu laboratorioon, on kaikkien tarvittavien välineiden oltava valmiina esillä. Biopsia otetaan esiin harsotaitosten välistä ja varmistetaan, että harsotaitokset ovat kostutettu keittosuolalla. Näyte pienennetään tarvittaessa kertakäyttöveitsellä viiltämällä (ei sahaten), mikäli se on suurempi kuin 5-6 mm³, sillä liian isot palat jäätyvät hitaasti. Näytteestä otetaan myös talteen 1 x 1 x 1 mm:n paloja 2 % glutaraldehydiin elektronimikroskopiaa varten (elektronimikroskopia tehdään vain tarvittaessa). Pienennyksen jälkeen näyte asetellaan korkille (kuva 6) leikkausta varten, stereomikroskooppia apuna käyttäen. Stereomikroskooppi mahdollistaa näytteen tarkastelun mistä suunnasta tahansa, jolloin voidaan varmistaa lihassyiden oikea kulkusuunta. Näytteestä tehdään tavallisesti poikkileikkeitä ja pyydettäessä pituusleikkeitä. Kun syiden kulkusuunta on varmistettu, palat liimataan korkkiin kudoksiin (Tissue-Tek) avulla. (Fimlab Laboratoriot Oy 2014.)



KUVA 6. Näytteiden kiinnitys korkkiin (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

Kun näytteet ovat liimautuneet korkkiin, ne jäädytetään (Fimlab Laboratoriot Oy 2014). Näytteet tulee jäädyttää mahdollisimman tuoreena, jotta kudos säilyisi mahdollisimman paljon alkuperäisen kaltaisena. Jäädytyksen aikana kudoksen sisältämä vesi muuttuu jääksi kudoksessa. Tällöin kudos kovettuu ja kudoksesta voidaan leikata jääleikkeitä. Jäädytyksen tulisi tapahtua mahdollisimman nopeasti, jotta jääkiteitä ei syntyisi näytteen sisälle. Jääkiteet vaurioittavat ja aikaansaavat rakenteellisia muutoksia kudoksessa. (Suvarna ym. 2014, 131- 132.)

Näyte jäädytetään isopentaanin ja -196 asteisen nestetyypen avulla. Jäädytys tapahtuu nestetyypeä sisältävän astian (styrox-kotelo) avulla. Astiaan asetellaan pienempi astia (kuparilieriö) joka sisältää isopentaania, jolloin nestetyppi jäähdyyttää isopentaanin. Kun isopentaani on riittävän kylmää, korkissa oleva näyte upotetaan pinseteillä nesteeseen (kuva 7). Näytettä jäädytetään noin minuutti liikutellen. (Fimlab Laboratoriot Oy 2014.) Jäädytysaikojen noudattaminen on erittäin tärkeää, sillä liian lyhyt jäädytysaika voi saada aikaan jääkiteiden muodostumisen syiden sisään, kun taas liian pitkä jäädytysaika saattaa rikkoa korkin (Dubowitz & Sewry 2007, 13). Jäädytyksen jälkeen näyte siirretään nestetyypeä sisältävässä astiassa kryostaattiin identifioitavaksi. Mikäli yhdellä korkilla on useampia näytteitä, ne erotellaan toisistaan leikkaamalla korkki osiin. Jäädytetty näyte säilytetään syväjäähäpakkastimessa. Mikäli näytettä joudutaan siirtämään tilasta toiseen, on siirron tapahduttava riittävän kylmässä astiassa. (Fimlab Laboratoriot Oy 2014.) Jäädytyksen jälkeen näyte ei saa sulaa missään vaiheessa (Raheem 2013). Mikäli näyte pääsee sulamaan jäädytyksen jälkeen, siihen voi muodostua jääkideartefaktaa, mikä voi haitata värjäystuloksen tulkintaa (Suvarna ym. 2013, 132).



KUVA 7. Näytteen jäädytys isopentaanissa ja nestetyypessä (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

4.3.2 Jääleikkeiden valmistaminen

Jäädetytty lihasnäyte leikataan kryostaatilla. Ennen leikkeiden leikkaamista jäädetytyn näytteen tulee tasapainottua -20:n asteen pakastimessa vähintään puoli tuntia, mutta enintään 3 tuntia ennen leikkausta. Tasapainotuksen jälkeen korkki kiinnitetään kryostaatin istukkaan kudoksiinan (Tissue-Tek) avulla. (Raheem 2013.) Laadukkaan leikkeen aikaan saamiseksi kudoksen tulee olla hyvin jäädetytyn ja kryostaatin veitsen terävä sekä puhdas. Kryostaatin lämpötilan tulee olla -13:n ja -16:n asteen välillä. (Syvarna ym. 2013, 131-132.)

Immunohistokemiallisia värjäyksiä varten NMP-laboratoriossa leikataan 6 µm:n paksuisia jääleikkeitä (kuva 8) huoneenlämpöisille superfrost plus-objekttilasille (Raheem 2013). Superfrost plus-laseja suositetaan, koska leikkausvaiheessa leikkeet tarttuvat helposti lasille ja pysyvät tiukasti lasilla koko prosessin ajan (ThermoFisher scientific 2015). Näille laseille on yleensä lisätty etukäteen terveestä luustolihasesta tehty normaalikontrolli. Leikkeitä leikataan tavallisesti jokaisesta näytteestä (tavallisesti 3 kappaletta/potilas) kaksi kappaletta, jolloin yhdelle lasille tulee kuusi leikettä ja yksi normaalikontrolli. Yhteensä lasilla on siis seitsemän leikettä. (Luhtasela 2015.) Leikkauksen jälkeen leikattu näyte irrotetaan veitsellä istukasta ja palautetaan takaisin omalle paikalleen syväjäähäpääkasteeseen (Raheem 2013).



KUVA 8. Jääleikkeiden leikkaaminen kryostaatilla (Kuva: Sanni Niemine & Menna Sirola 2015)

4.3.3 Perusvärjäyssarja

Lihاسبiopsioiden perusvärjäyksiä tehdään tavallisesti yliopistosairaaloiden patologian laboratorioissa. Kaikista uusista lihasbiopsioista tehdään jääleikkeistä perustutkimussarja, johon sisältyy Hematoksyliini-eosiini-värjäys, Gomorin trikromi-värjäys, NADH-tetrazolium reduktaasi-värjäys, SDH-COX (sukkinaattidehydrogenaasi-sytokromi-C-oksidaasi) -värjäys (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2015) ja immunohistokemiallisia värjäyksiä, jotka esitellään myöhemmin tässä työssä.

Hematoksyliini-eosiini-värjäyksessä hematoksyliini värjää syiden tumat siniseksi ja eosini värjää sytoplasman sekä sidekudoksen vaaleanpunaisen, oranssin ja punaisen eri sävyillä (Suvana ym, 2013, 173). Värjäyksen avulla voidaan tarkastella syiden rakennetta. Joissakin lihastaudeissa lihassyiden koossa ja muodossa havaitaan muutoksia. Terveessä lihaksessa syyt ovat säännöllisen muotoisia ja tasakokoisia. (Isohanni & Pihko 2014, 176.) Gomorin trikromi- värjäystä käytetään lihaksen sidekudoskomponenttien ja fibriinin erotteluun toisistaan (Carson & Hladik 2009, 165). Trikoromivärjäyksessä lihas-syyt värjäytyvät vihertävän siniseksi ja kollageeni värjäytyy kevyemmin. Tuma värjäytyy punaiseksi gomorilla. Värjäyksellä voidaan tunnistaa myös punaiseksi värjäytyviä epänormaaleja mitokondrioita. (Dubowitz & Sewry 2007, 23.) NADH-tetrazolium reduktaasi-värjäyksellä tutkitaan mitokondrioiden NADH-dehydrogenaasin entsyymiaktiiviteettiä (UniProtKB 2016b). Mitokondrioiden toimintahäiriötä voidaan selvittää osoittamalla sukkinaattihydrogenaasin (SDH) ja sytokromi-c-oksidaasin (COX) aktiivisuus ja paikantuminen lihassyissä SDH-COX-värjäyksessä (UniProtKB 2016c).

5 IMMUNOHISTOKEMIAALLISET VÄRJÄYKSET

Diagnostinen immunohistokemia on kehitetty 1960 – ja 1970-lukujen aikana alun perin kasvainten luokitteluun ja erotusdiagnostiikkaan. Tekniikoiden kehityttyä ja kaupallisten vasta-aineiden saatavuuden parannuttua 1990-luvulla immunohistokemia otettiin käyttöön laajemmin ja nykyään sitä käytetään useiden eri sairauksien diagnostiikassa ja tutkimisessa. (Mäkinen & Stenbäck 2012, 1133.) Lihastautien diagnostiikka on nykyään yksi immunohistokemian käyttöalueista.

5.1 Immunohistokemian perusteet

Immunohistokemia on menetelmä, joka perustuu vasta-aineiden kykyyn tunnistaa proteiineja ja muita kudosanigeneja spesifisesti (Renshaw 2007, 1). Antigeeni on molekyyli, joka saa aikaan vasta-aineen muodostuksen ja se sisältää yhden tai useamman vasta-aineelle spesifisen tunnistuskohdan eli epitoopin. Vasta-aineet ovat muun muassa veressä ja kudostesteissä esiintyviä proteiinimolekyyliä, joita tuotetaan plasmasoluissa. Vasta-aineet voidaan jakaa viiteen immunoglobuliiniluokkaan (IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM) niiden rakenteen perusteella, joista IgG- luokan vasta-aineet ovat eniten käytettyjä immunohistokemiassa. (Suvarna ym. 2013, 383.)

Immunohistokemiassa antigeenien tunnistamiseen käytettävät vasta-aineet voivat olla joko polyklonaalisia tai monoklonaalisia. Polyklonaaliset vasta-aineet tuotetaan eläimessä, joka immunisoidaan tietyille antigeenille. Immunisaation seurauksena eläimen vasta-ainevälitteinen immunitetti aktivoituu ja sen plasmasolut alkavat tuottaa vasta-aineita antigeenin epitooppeja kohtaan. Koska polyklonaaliset vasta-aineet tunnistavat antigeenistä useita eri epitooppeja, ovat ristireaktiot muiden proteiinien kanssa mahdollisia. (Suvarna ym. 2013, 384.) Tämä voi aiheuttaa taustavärjäytymistä näytteessä, mikä häiritsee tuloksen tulkintaa (Carson & Hladik 2009, 278).

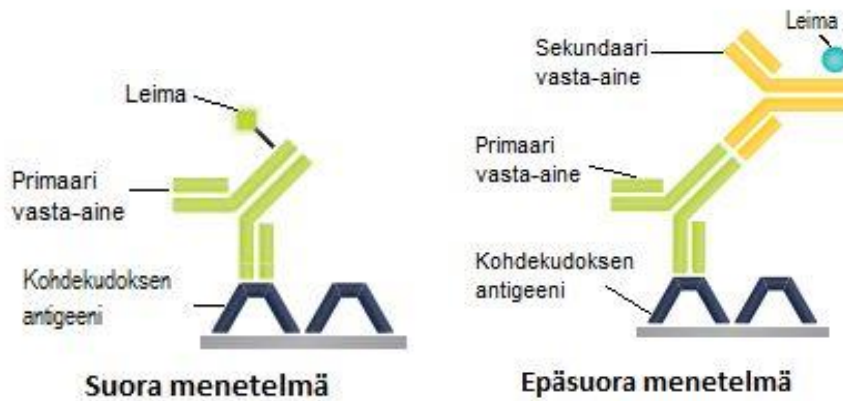
Kuten polyklonaalisten, myös monoklonaalisten vasta-aineiden tuotanto perustuu koe-eläimen immunisointiin tiettyä antigeenia kohtaan. Eläin immunisoidaan tietyille antigeenille, minkä jälkeen sen pernasta eristetään lymfosyyttejä, jotka yhdistetään viljeltyjen

myeloomasolujen kanssa. Näistä valikoidaan yhdistyneet- eli hybridoomasolut, jotka siirretään kasvatusliuokseen. Hybridoomasolut jakaantuvat kasvatusliuoksessa ja sen solukloonit tuottavat tiettyä vasta-ainemolekyyliä eli monoklonaalista vasta-ainetta, joka on spesifinen antigeenin yhtä tiettyä epitooppia kohtaan. Hybridoomasolut voidaan eristää kasvatusliuoksesta ja siirtää tuottoeläimeen, josta vasta-aine voidaan kerätä talteen. (Buchwalow & Böcker 2010, 4-5; Suvarna ym. 2013, 384.)

Hiiressä tuotettuja monoklonaalisia vasta-aineita käytetään primaarivasta-aineina niiden spesifisyyden, puhtauden, rajattomasti jatkuvan tuotannon ja kaupallisen saatavuuden takia. Vasta-aineiden korkea spesifisyys voi jossain tapauksissa vähentää niiden affiniteettiä, mikä puolestaan vähentää vasta-aineen herkkyyttä. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat kuitenkin monoklonaalisia vasta-aineita herkempiä ja saavat aikaan voimakkaamman värireaktion sekä pystyvät tunnistamaan hyvin pieniä määriä antigeeniä, mutta samalla ristireaktioiden mahdollisuus kasvaa. (Taylor & Rudbeck 2013, 48.)

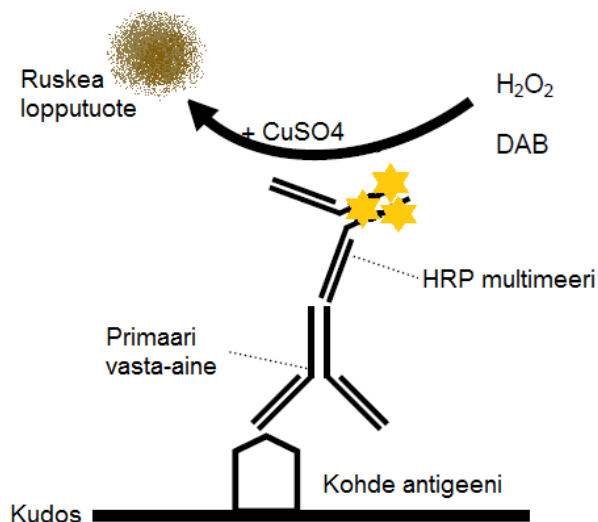
5.2 Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät

Vasta-aineen kiinnittyminen kohdeantigeeniin voidaan havaita vasta-aineeseen liitetyn leiman avulla (Suvarna ym. 2013, 382). Entsyymit ovat eniten käytettyjä leimoja immunohistokemiassa, mutta käytössä on myös immunofluoresenssimenetelmiä, jossa leimana toimii valoa emittoiva fluorokromi, joka voidaan havaita fluoresenssimikroskoopissa (Carson & Hladik. 2009, 283). Immunohistokemiassa entsyymileima voi olla konjugoituna primaari- tai sekundaarivasta-aineeseen (kuva 9). Suorassa menetelmässä leima on konjugoituna primaarivasta-aineeseen. Epäsuorassa menetelmässä leima on konjugoituna sekundaarivasta-aineeseen, joka on kiinnittynyt primaarivasta-aineeseen, joka puolestaan on kiinni antigeenissä. (Suvarna ym. 2013, 386-388.) Epäsuora menetelmä on sensitiivisempi, koska useita sekundaarisia vasta-aineita voi liittyä primaariseen vasta-aineeseen, joten värireaktio on voimakkaampi (Buchwalow & Böcker 2010, 33).



KUVA 9. Suora ja epäsuora menetelmä (mukailtu Taylor & Rudbeck 2013, 14)

Piparjuuren peroksidaasi (engl. *horseradish peroxidase* eli HRP) on eniten käytetty entsyymi immunohistokemiassa. 3,3'-diaminobenzidiini tetrahydrokloridi (DAB) on menetelmässä käytetty kromogeeni, mikä saa kemiallisen reaktion seurauksena aikaan liukenemattoman ja pysyvän tumman ruskean värin lopputuotteena (kuva 10). (Suvarna ym. 2013, 385.) HRP:n katalysoimassa reaktiossa vetyperoksidi (H_2O_2) hajoaa vedeksi ja happiatomiksi. Vetyperoksidin katalyysin ylläpitämiseksi tarvitaan elektronin luovuttaja, jonka HRP-entsyymi lopulta hapettaa. Tässä tapauksessa elektronin luovuttajana toimii kromogeeni (DAB), joka on ennen reaktiota pelkistyneessä muodossa vesiliukoinen ja väritön. Hapettuessaan DAB muuttuu värilliseksi lopputuotteeksi. (Kumar & Rudbeck 2009, 16-17.) Reaktio voidaan havaita valomikroskooppissa (Suvarna ym. 2013, 384-385).



KUVA 10. UltraView DAB Detection Kitin reagenssien aikaan saama reaktio (mukailtu ultraView... 2011, 1)

5.3 VENTANA BenchMark GX värjäysautomaatti

NMP-laboratoriossa immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjykset tehdään VENTANA BenchMark GX värjäysautomaatilla (kuva 11) (BenchMark GX, 2013). Laitteessa on käytössä UltraView Universal DAB Detection Kit (ultraView Universal DAB Detection Kit 2011, 1). Kitti hyödyntää menetelmää, jossa sekundaarivasta-aineeseen on liitetty useita HRP-entsyymejä. Kompleksia kutsutaan HRP multimeeriksi. Ventanan käytämä menetelmä on siis epäsuora. (ultraView... 2011, 1.) Biotiinivapaa menetelmä vähentää epäspesifiä taustavärjäytymistä ja pieni multimeerimolekyylä lisää herkkyyttä (ultraView... 2009). Kitin sekundaarivasta-aineet sopivat hiiren IgG ja IgM sekä kanin IgG luokan vasta-aineiden tunnistamiseen (ultraView... 2011, 1).



KUVA 11. VENTANA BenchMark GX värjäysautomaatti (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2016)

5.3.1 Ventanan värjäysprotokolla

Ventana hyödyntää tekniikkaa, jossa näytelasin päälle lisätty nestemäinen kerros muodostaa niin sanotun reaktiokammion, jossa on optimoidut olosuhteet värjäysreaktioille. Nestemäinen kerros lasin päällä vähentää haihtumista, suojaa kudosta ja minimoi reagenssien käytön. Reagenssit sekoittuvat nestemäisen kerroksen alla ilmavirran vaikutuksesta. Jokaisen yksittäisen lasin alla on lämmitysalusta, joka säätelee yksittäisen lasin lämpötilaa. (BenchMark GX 2013.)

Immunohistokemiallisen värjäyksen vaiheisiin kuuluu;

1. Endogeenisten, eli kudoksessa itsessään olevien, entsyymien blokkaukset.
2. Primaari vasta-aineen lisäys.
3. Sekundaari vasta-aineen lisäys.
4. Kromogeenin (DAB) lisäys.
5. Taustaväri lisäys.
6. Leikkeiden kuljetus, kiinnitys ja päällystys.

(Taylor & Rudbeck 2013, 12.)

Näytteiden värjäykseen käytettiin pääasiassa Ventanan perusohjelmaa; Lihaskudoksen IHC – 505 (Luhtasela, Kojo & Kariniemi 2014, 3). Kohdekudoksen endogeeninen entsyymiaktiivisuus saattaa aiheuttaa värjäyksessä vääriä positiivisia tuloksia, jos ne ovat samankaltaisia värjäyksessä käytettävien entsyymien kanssa ja siten reagoita sen substraatin kanssa. (Suvarna ym. 2013, 402). Sen takia ensimmäinen työvaihe on tarpeellinen. Entsyymiblokkereita käytetään inhiboimaan entsyymien vaikutusta kohdekudoksessa, kun kudoksessa on luonnostaan peroksidaasia. Vetyperoksidia käytetään yhdessä HRP-entsyymien kanssa estämään endogeenista entsyymiaktiivisuutta. Blokkeri voidaan lisätä ennen tai jälkeen primaarivasta-aineen, mutta ennen sekundaari vasta-ainetta. (Suvarna ym. 2013, 105.) Ventana lisää UV INHIBITOR reagenssin (entsyymiblokkeri) ennen primaari vasta-aineen lisäystä. Lasia inkuboidaan pesuliuoksessa 2 minuutin ajan ennen entsyymiblokkerin lisäystä. Lasia inkuboidaan 4 minuutin ajan lisäyksen jälkeen ja huuhdellaan ennen primaarivasta-aineen lisäystä. (Protocol #505 2008.)

Värjäyksissä käytetyt primaari vasta-aineet ovat kaupallisesti hankittuja eri vasta-aine valmistajilta eri puolilta maailmaa. Primaarivasta-aineet lisätään manuaalisesti pipetoidulla yksittäisen lasin päälle ja inkuboidaan 32 minuutin ajan (Protocol #505 2008). Inkubaation aikana primaarivasta-aine kiinnittyy kohdekudoksen antigeeneihin (Taylor & Rudbeck 2013, 12). Primaari vasta-aineen lisäys on mahdollista tehdä myös automaattilla, mutta NMP-laboratoriossa työvaihe tehdään manuaalisesti. Työvaihe on perusteltua tehdä manuaalisesti, koska näytemäärät ovat pieniä ja yksittäistä vasta-ainetta tarvitaan pieniä määriä. (Luhtasela 2016.) Seuraavassa vaiheessa laite lisää automaattisesti ultra-view Universal HRP Multimer reagenssiseoksen (Protocol #505 2008), joka pitää sisällään vuohessa tuotettuja HRP- entsyymillä leimattuja sekundaari vasta-aineita (ultra-View... 2011, 1). Laseja inkuboidaan 8 minuutin ajan, minkä aikana sekundaari-vasta-aineet liittyvät primaarivasta-aineisiin (Protocol #505, 2008; Taylor & Rudbeck 2013, 107).

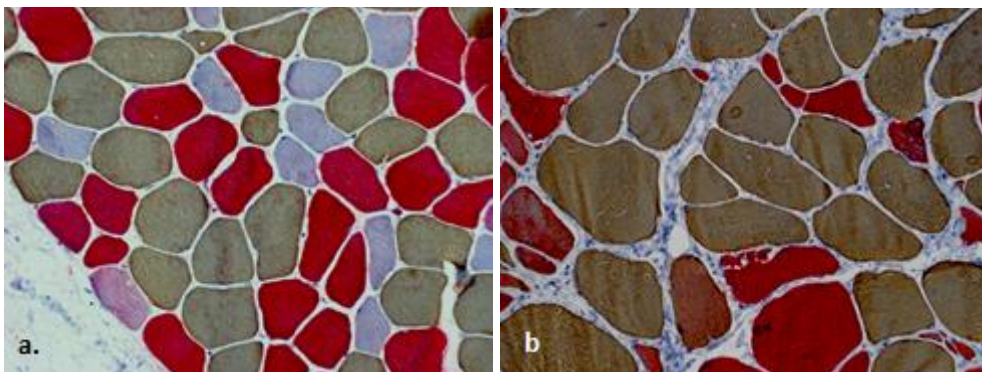
Laite lisää lasille automaattisesti ultraView Universal DAB Chromogen- reagenssin ja ultraView Universal DAB H202 reagenssin (Protocol #505 2008), eli toisin sanoen kromogeenin ja vetyperoksidin (ultraView... 2011, 1). Laite inkuboi laseja yhteensä 8 minuutin ajan, minkä jälkeen laite lisää ultraView Universal DAB Copper reagenssin (Protocol #505 2008), joka pitää sisällään kuparisulfaattia asetaattipuskurissa (ultraView... 2011). Laite inkuboi laseja 4 minuutin ajan. (Protocol #505 2008). Kromogeenin ja muiden reagenssien lisäyksen jälkeen tapahtuu kemiallinen reaktio, joka on esitelty kappaleessa 5.2.

Lopuksi laite lisää laseille hematoksyliiniä taustavärjäystä varten (Protocol #505 2008). Hematoksyliinia käytetään solujen tumien värjäykseen ja se on eniten käytetty taustaväri immunohistokemiassa. Taustaväri valitaan kromogeenin antaman värin mukaan. Tässä tapauksessa käytetään hematoksyliinia, sillä se voidaan helposti erottaa kromogeenin aikaan saamasta ruskeasta lopputuotteesta ja välttyään vääriltä positiivisilta tuloksilta. (Renshaw 2007, 61-62.) Lopuksi taustaväri viimeistellään litiumkarbonaattia sisältävällä bluing-reagenssilla ja inkuboidaan 4 minuutin ajan (Protocol #505 2008). Ohjelman päätyttyä laseilta huuhdellaan öljy pois ja ne kirkastetaan nousevalla alkoholisarjalla, pedataan ja päällystetään (Luhtasela ym. 2014, 4).

5.3.2 Perussarjan immunohistokemialliset värjäykset

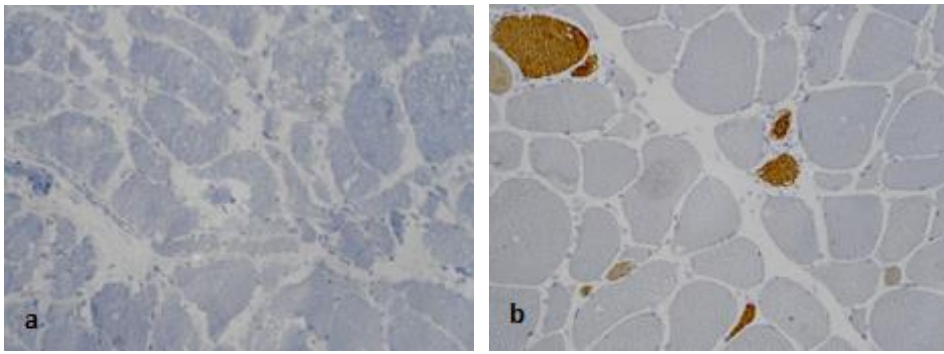
Perusvärjäyssarjan immunohistokemiallisiin värjäyksiin lukeutuu myosiinin immunohistokemiallinen kaksoisvärjäys (MHCS+A4), kehitysvaiheen myosiinien (MHCn & MHCd) immunohistokemialliset värjäykset ja antigeenijä presentoivan molekyylin HLA class 1 (major histocompatibility class 1) immunohistokemiallinen värjäys. Kaikista uusista lihasbiopsioista tehdään edellä mainitut immunohistokemialliset värjäykset. (Pirkanmaansairaanhoidopiiri 2015.)

Myosiinin kaksoisvärjäyksellä pystytään erottamaan hitaat- (I) ja nopeat lihassytt (IIa ja IIx) sekä hybridisyyt, jotka ovat sekoitus IIa ja IIx soluja (Palmio & Udd 2015). Värjäyksessä on käytössä kaksi eri vasta-ainetta; Myosin Heavy Chain (slow) (MHCS) ja A4.74. MHCS värjää hitaat syytyypit ruskeaksi ja A4.74 nopeat syytyypit IIa punaiseksi, IIx siniseksi sekä hybridisyyt roosan värisiksi. (Lindfors 2016.) Kuvassa 12a on terveen luustolihasen normaalikontrolli, jossa on nähtävissä kaikkia eri syytyyppejä. Kuvassa 12b on potilasnäyte, josta voidaan nähdä syytyyppien poikkeavuuksia.



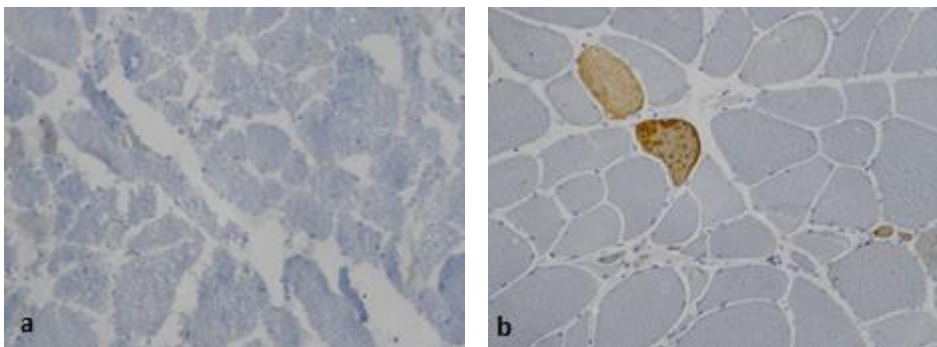
KUVA 12. Myosiinin kaksoisvärjäys (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

Myosin Heavy Chain Developmental (MHCd)- värjäyksellä voidaan osoittaa sytoplasmassa sijaitseva proteiini, jota esiintyy alkio- ja sikiökaudella sekä lihassyiden regeneroitessa (Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Myosin Heavy Chain (developmental)). Kuvassa 13a on värjäyksen normaalikontrolli ja kuvassa 13b potilasnäyte, jossa epänormaali kertymä on nähtävissä ruskeana värinä lihassyissä. Värjäyksessä voidaan myös havaita surkastuneita lihassyitä.



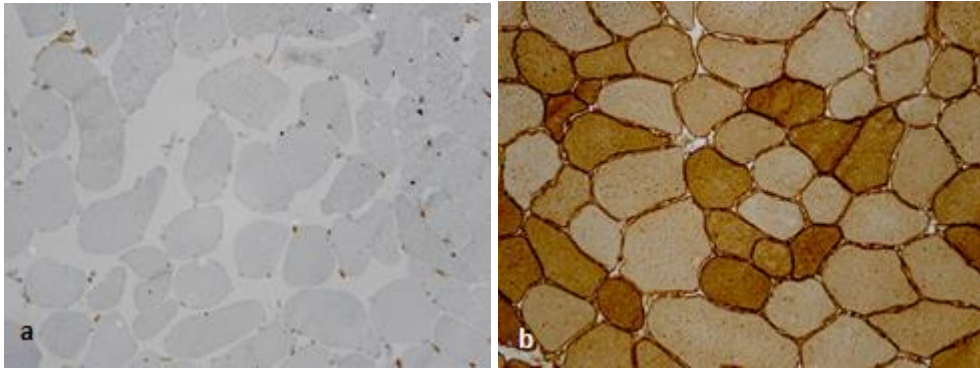
KUVA 13. Myosin Heavy Chain Developmental (MHCd)- värjäys (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

Myosin Heavy Chain Neonatal (MHCn)- värjäyksessä sytoplasmassa sijaitseva proteiini, joka normaalisti häviää sikiökauden jälkeen, värjäytyy ruskealla värillä (Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Myosin Heavy Chain (neonatal)). Kuvassa 14a on esitetty normaalikontrolli ja kuvassa 14b patologinen potilasnäyte. Epänormaali kertymä näyttäytyy ruskeana värinä patologisessa näytteessä.



KUVA 14. Myosin Heavy Chain Neonatal (MHCn)- värjäys (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

HLA class 1- värjäyksessä voidaan havaita ruskeaa kertymää tietyissä lihastaudeissa (Lindfors, 2016). Proteiinia esiintyy kaikkien nukleaaristen solujen, mukaan lukien lihassolujen, pinnalla glykolysoituneessa muodossa. Molekyylit reagoivat tietyntyyppisten lymfosyyttien kanssa. (Delves 2014.) Kuvassa 15a on esitetty normaalikontrolli ja kuvassa 15b patologinen näyte.



KUVA 15. HLA class 1- värjäys (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

Lisäksi lihasbiopsiasta voidaan pyytää immunohistokemiallisia lisävärjäyksiä, joiden avulla voidaan tunnistaa kudoksen proteiineja ja antigeenejä spesifisti (Pirkanmaansairaanhoitopiiri 2015). Lihastaudin lopulliseen diagnoosiin päästään usein vasta monien eri tutkimusten jälkeen. Koska lihastauteja on paljon potilasmäärään nähden, on niiden diagnostiikka ja hoitojen kehittäminen haastavaa. Joskus lopullisen diagnoosin varmistumiseen saattaa kulua useampia vuosia. (Jokela & Udd 2014, 2969.)

5.4 Laatu immunohistokemiassa

Immunohistokemiallinen värjäys on monivaiheinen prosessi, jossa tekijällä on oltava ymmärrys menetelmän vaiheista ja siihen liittyvistä vaatimuksista. Koska immunohistokemiasta on tullut oleellinen osa monien tautien diagnostiikkaa ja ennusteen tekemistä sekä värjäysten tulokset saattavat vaikuttaa suoraan potilaan hoitoon tai diagnoosiin, tulee värjäysten laadunvarmistus olla kunnossa. Värjäysprosessin tulisi olla aina jäljitettävissä ja seurata aina samaa kaavaa, jotta voidaan palata mahdollisiin ongelmakohtiin. Automaatio helpottaa prosessia käyttämällä standardoituja menetelmiä. (Suvarna ym. 2013, 435.)

Laadukkaan värjäyksen aikaan saamiseksi värjäyksessä käytettäviä reagensseja tulee käsitellä ja säilyttää asianmukaisesti. Erityisesti huomiota tulee kiinnittää vasta-aineiden säilytys lämpötilaan ja laimennosliuosten pH- tasapainoa tulee seurata. Myös näytelasit, joille kontrollinäytteet on jo valmiiksi leikattu, tulee säilyttää asianmukaisesti ja oikeissa lämpötiloissa. Automaatio helpottaa menetelmien toistettavuutta. (Suvarna ym. 2013, 438-439.)

Kontrollit ovat osa sisäistä laaduntarkkailua (Suvarna ym. 2013, 435). NMP- laboratoriossa käytetään immunohistokemiallisissa värjäyksissä kontrollina normaalia lihasta, jotta nähdään miltä normaali lihas näyttää värjäyksessä ja onko värjäys ylipäätään onnistunut (Luhtasela 2016). Kontrollin avulla voidaan helposti havaita, jos esimerkiksi jokin tärkeä työvaihe on jäänyt tekemättä, kuten esimerkiksi primaarivasta-aineen lisäys (Ultra-View... 2011, 2-3). Kontrollia käytetään siis samalla lasilla kuin itse näytettä, joten se käy läpi kaikki samat vaiheet kuin itse näyte.

6 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Ammattikorkeakoulusta saadun koulutuksen tavoitteena on, että valmistuttuaan opiskelija toimii alansa asiantuntijatehtävissä ja tietää että taitaa siihen liittyvät kehittämisen ja tutkimuksen perusteet (Vilka & Airaksinen 2003, 10). Opinnäytetyö on ammattikorkeakoulun loppuvaiheessa tehtävä työ, joka on eräänlainen osoitus siitä, mitä opiskelija on oppinut opintojensa varrella (Hakala 2004, 7). Ammattikorkeakoulussa tehdyn opinnäytetyön tulisi olla työelämälähtöinen, käytännön läheinen, tutkimuksellisesti toteutettu ja riittävällä tasolla alan tietojen ja taitojen hallintaa osoittava kokonaisuus (Vilka & Airaksinen 2003, 10).

Toiminnallinen opinnäytetyö on kokonaisuudessaan kaksiosainen ja se sisältää toiminnallisen osuuden eli tuotoksen ja opinnäytetyöraportin. Työn toiminnallinen osuus voi olla esimerkiksi opas, näyttely, kehittämissuunnitelma tai jokin muu tuotos tai projekti. Toiminnallisen opinnäytetyön aihe lähtee usein toimeksiantajan tarpeesta ja sen tavoitteena onkin kehittää ja ohjeistaa käytännön toimintaa työelämässä. Toiminnallisen opinnäytetyön tuotoksen tulee pohjautua vahvasti teoreettiselle perustalle ja tekijöiden tulee perehtyä hyvin kyseisen aiheen teoretietoon. (Lumme ym. 2006.)

Toiminnallisen opinnäytetyön raporttiosa kuvailee opinnäytetyöprosessia. Siitä selviää mitä, miksi ja miten on tehty, millainen työprosessi on ollut sekä millaisiin tuloksiin ja johtopäätöksiin on päädytty. Raportista ilmenee myös se, miten työn tekijä/tekijät arvioivat opinnäytetyöprosessia, tuotosta ja omaa oppimista. Raportin perusteella lukija voi päätellä, miten opinnäytetyöprosessissa on onnistuttu. (Vilka & Airaksinen 2003, 65.)

Opinnäytetyömme täyttää tarvittavat kriteerit toiminnalliselle opinnäytetyölle. Työmme on toiminnallinen, koska siihen sisältyy sekä raporttiosuus että tuotos. Työllämme on ulkopuolinen toimeksiantaja ja sitä kautta myös tilaaja. Opinnäytetyön tuotoksena on kuvakansio tutkimusyksikössä käytössä olevista immunohistokemiallisista lihasbiopsiavärjäyksistä. Tuotos tehdään tilaajan käyttöön värjäysten laadun arviointiin ja uusien työntekijöiden perehdytykseen.

7 PROSESSIN KUVAUS

Saimme opinnäytetyön aiheen keväällä 2015, minkä jälkeen aloitimme opinnäytetyösuunnitelman kirjoittamisen. Kävimme myös keskustelemassa toimeksiantajan ja ohjaavan opettajan kanssa opinnäytetyöprosessista. Esitimme opinnäytetyösuunnitelman opinnäytetyöseminaarissa toukokuussa 2015, minkä jälkeen saimme palautetta suunnitelmasta ohjaavalta opettajalta sekä opiskelijaopponenteilta. Palautteen perusteella muokkasimme suunnitelmaamme ja saimme sen valmiiksi elokuussa 2015, jolloin allekirjoitimme myös opinnäytetyösopimuksen ohjaavan opettajan ja toimeksiantajan kanssa. Allekirjoitusten jälkeen pääsimme virallisesti aloittamaan opinnäytetyön tekemisen.

7.1 Toiminnallisen osuuden toteutus

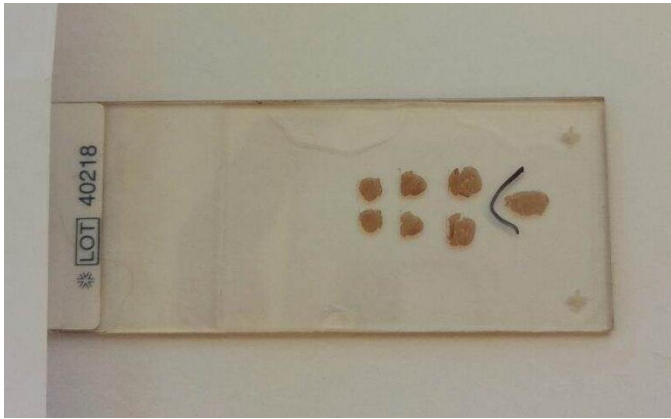
Aloitimme opinnäytetyön raporttiosuuden työstämisen elokuussa 2015, jolloin syvennymme luustolihaksen anatomiaan, immunohistokemiaan ja lihasbiopsian käsittelyyn. Tämä tuntui luonnolliselta lähestymistavalta, koska halusimme ymmärtää aiheeseen liittyvää teoriaa ennen opinnäytetyön toiminnallisen osuuden aloitusta. Sovimme samoihin aikoihin NMP-laboratorion kanssa, että aloitamme opinnäytetyön käytännön osuuden toteutuksen lokakuussa 2015.

Käytännön osuus piti sisällään lihasbiopsianäytteiden immunohistokemiallisen värjäyksen ja kuvaamisen. Aloitimme kuvakansion tekemisen NMP-laboratoriossa tutustumalla ensin värjäysprosessiin. Värjäysten teon lisäksi pääsimme seuraamaan lihasbiopsian ottoa ja -jäädystä sekä näytteiden leikkaamista kryostaatilla. Kuvakansioon kokosimme yhteensä 42 erilaista immunohistokemiallista värjäystä. Näistä värjäyksistä 23 oli meille valmiiksi värjätty ja 19 värjäsimme itse. Värjäysten tekoon kului kaksi ensimmäistä päivää ja kuvaamiseen kolme päivää.

7.1.1 Värjäysten valmistelu

Jääleiketekniikalla valmistetut lihasbiopsianäytteet olivat leikattu valmiiksi näytelaseille. Näytelasilla oli yleensä seitsemän leikettä, joista yksi oli normaalikontrolli (kuva 16),

joka oli kiinnitetty lasille jo ennen varsinaisen potilasnäytteen leikkaamista. Potilasnäytteen leikemäärä lasilla saattoi vaihdella tai normaalikontrolli saattoi olla joissakin tapauksissa erillisellä lasilla. Ennen värjäystä annoimme näytelasien tasapainottua huoneenlämmössä 30 minuuttia, jonka aikana valmistimme primaarivasta-ainelaimennokset.



KUVA 16. Lihasbiopsialeikkeet Super frost plus- lasilla (Kuva: Menna Sirola 2016)

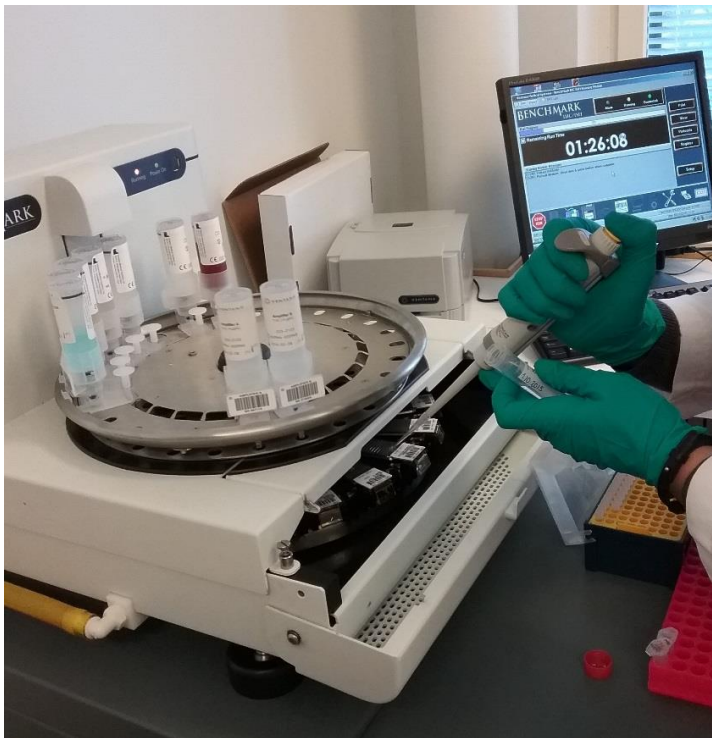
Aloitimme värjäysprosessin perehtymällä huolellisesti työohjeisiin. Vasta-ainelaimennoksiin vaadittavat konsentraatiot olivat ilmoitettu värjäysten työohjeessa. Näin ollen lasimme jokaiselle värjäykselle tarvittavien vasta-aine ja laimennusliuoksen määrän työohjeessa ilmoitetun konsentraation mukaisesti. Tämän jälkeen aloitimme vasta-ainelaimennosten valmistuksen. Otimme primaarivasta-aineet esille joko jääkaapista tai pakasesta, jolloin sulatimme ne.

Valmistimme primaarivasta-ainelaimennokset laimentamalla kaupalliset vasta-aineet laitevalmistajan (Ventana) omaan laimennusliuokseen pipetoimalla. Jokaiselle näytelasille tarvittiin 100µl vasta-ainelaimennosta. Koska jokaisessa värjäyksessä värjättiin eri proteiinia, tarvitsimme 19 eri vasta-ainetta, paitsi CD31+MAC-värjäyksessä käytettiin kahta vasta-ainetta. Värjäyksestä riippuen vasta-ainekonsentraatio vaihteli 1:5 ja 1:10 000 välillä. Valmistimme jokaisen vasta-ainelaimennoksen ennalta nimeämiimme eppendorfputkiin pipetoimalla ensin laimennusliuoksen, jonka jälkeen pipetoimme vasta-aineen. Lopuksi vortexoimme vasta-aineliuokset huolellisesti.

7.1.2 Ventana- värjäysautomaatin käyttö

Primaarivasta-aineiden valmistuttua kytkimme VENTANA BenchMark GX- värjäysautomaatin käyttökuntoon. Käytimme pääasiassa Ventanan perusohjelmaa; Lihas IHC 505, mutta myösiinin kaksoisvärjäyksessä käytimme ohjelmaa 502 ja MAC & CD31 kaksoisvärjäys ohjelmaa 526. Tämän jälkeen asettelimme näytelasit näytekaruaselliin ja lisäsimme *ultraView Universal DAB Detection Kit*- reagenssitarjottimen laitteeseen. Otimme reagenssitarjottimen jääkaapista ja poistimme siitä korkit, minkä jälkeen asetimme sen laitteeseen. Tarvittavien reagenssien lisäyksen jälkeen, käynnistimme laitteen.

Ventana- värjäysautomaatin toiminta on muuten automatisoitu, mutta primaarivasta-aineet on lisättävä näytelaseille manuaalisesti (kuva 17). Manuaalinen lisäys tapahtuu alku tasapainotuksen ja endogeenisen peroksidaasin blokkauksen jälkeen. Tämän jälkeen Ventana tekee tarvittavat pesut, lisää sekundaari-vasta-aineen, johon entsyymi (HRP) on konjugoituna ja kromogeenin (DAB) sekä tekee vastavärjäyksen Mayerin hematoksyliinillä. Kaksoisvärjäyksiin lisäsimme kaksi eri primaarivasta-ainetta ohjelman vaatimana ajankohtana. Ohjelma kesti kokonaisuudessaan muutaman tunnin.



KUVA 17. Primaarivasta-aineen lisäys (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2015)

Värjäysohjelman päätyttyä pesimme värjäysohjelmassa lasille lisätyn öljyn pois dekantterilasissa huuhtelemalla pesupuskurissa. Seuraavaksi kirkastimme näytteet manuaalisesti vetokaapissa nousevassa alkoholisarjassa. Lopuksi petasimme lasit manuaalisesti ja annoimme niiden kuivua kuvausta varten.

7.1.3 Värjäysten kuvaus ja kuvien kokoaminen kansiksi

Toteutimme näytelasien kuvaamiseen NMP-laboratoriossa paikan päällä mikroskooppikameraa apuna käyttäen. Kuvasimme jokaisen normaalikontrollin kahdella eri suurennoksella (10x ja 20x). Patologisia leikkeitä yhdellä näytelasilla oli yleensä 6 kappaletta, joista valikoimme laadukkaimman ja kuvasimme sen kahdella suurennoksella (10x ja 20x). Tallensimme kaikki kuvat (yhteensä noin 200 kappaletta) omille muistitikuillemme kuvakansion myöhempää kokoamista varten. Tämän ensimmäisen itsenäisen viikon jälkeen meillä alkoikin pitkä työharjoittelu, joten kuvakansion tekemiseen tuli taukoa, koska olimme työharjoittelussa eri paikkakunnilla.

Työharjoittelun loputtua maaliskuussa jatkoimme opinnäytetyöprosessia. Maaliskuussa etenimme paljon raporttiosuuden kanssa. Huhti- ja toukokuun 2016 aikana kokosimme kuvakansion kuvat lopulliseen muotoonsa. Aloitimme kuvakansion tekemisen koululla powerpoint-pohjaan. Toimeksiantajan toiveesta järjestimme kuvat kansioon värjäysten nimien perusteella aakkosjärjestykseen. Tässä vaiheessa toimeksiantaja tarkisti ja hyväksyi kuvat muutamin muutoksin.

7.1.4 Kuvakansion viimeistely

Vaikka olimme koonneet kuvakansion lopulliseen muotoonsa ja kuvat hyväksytyt toimeksiantajalla, kuvakansio ei ollut vielä täysin valmis. Kuvista puuttui värjäyksillä paikannettavien proteiinien sijainti/tehtävä lihassyssä. Sovimme toimeksiantajan kanssa, että menisimme alustavan kuvakansion kanssa NMP-laboratorioon, jotta voimme etsiä lisätietoa värjäyksistä niiden datasheeteista. Toimeksiantajan joustavuuden ansiosta saimme sovittua ajankohdaksi jälleen toukokuussa olevan opinnäytetyön itsenäisen viikon kolme ensimmäistä päivää.

Näiden päivien ajan selvitimme värjäyksillä paikannettavien proteiinien sijaintia lihassyssä datasheettien ja UniProt proteiini-tietokannan avulla sekä solubiologin ja opinnäytetyön ohjaajan kanssa. Mielestämme tämä oli yksi opinnäytetyön haastavimmista vaiheista, sillä työvaihe edellytti huolellista perehtymistä lihaksen solubiologiaan, eikä tehtävää helpottanut se, että käytettävissä olevat lähteet olivat englanniksi.

Kokosimme taulukkoon 1 kaikki kuvakansioon tulleet värjäykset. Taulukon vasemmassa sarakkeessa on esitetty värjäysten nimet, jotka tulevat pääasiassa värjättävien proteiinien nimistä. Oikeassa sarakkeessa on esitetty värjäyksillä paikannettavien proteiinien sijainti lihassyssä ja/tai proteiinin tehtävä. Vasemmassa sarakkeessa oleva keltainen väri merkitsee, että olemme tehneet värjäyksen itse. Valkoinen väri merkitsee, että värjäys oli tehty meille valmiiksi.

TAULUKKO 1. Lihasten immunohistokemialliset värjäykset (Lindfors 2016; Luhtasela 2016; NMPL_ihc_Vasta-ainelista 25042016 2016; Palmio & Udd 2015; Vasta-aine Datasheetit)

VÄRJÄYS	PROTEIININ SIJAINTI/TEHTÄVÄ
α- Actinin	Sarkomeerin proteiini.
α-B-Crystallin	Kaperoni, joka estää proteiinien aggregoitumista. Epänormaalia akkumuloitumista sairaassa lihaksessa.
α-Drystroglycan (IIH6)	Sarkolemma proteiini.
Actin	Sarkomeerin proteiini.
BAG3	Kaperonien toimintaa inhiboiva proteiini, jota esiintyy sytoplasmassa ja sarkolemassa.
Calsequestrin	Sarkoplasmisessa retikulumisissa sijaitseva kalsiumin varastointiin osallistuva proteiini, joka toimii yhteistyössä RYR-proteiinin kanssa.
Caveolin 3 (CAV3)	Sarkolemman proteiini.
CD31+MAC	Mac on spesifinen makrofageille, CD31 spesifinen leukosyyteille.
Chloride channel 1 (ClC1)	Sarkolemman kloridikanavaproteiini.
Desmin	Z-levyn proteiini.
DHPR	Kalsiumkanava reseptori.
DNAJB6	Kaperoniproteiini, jota esiintyy sytoplasmassa ja tumassa.

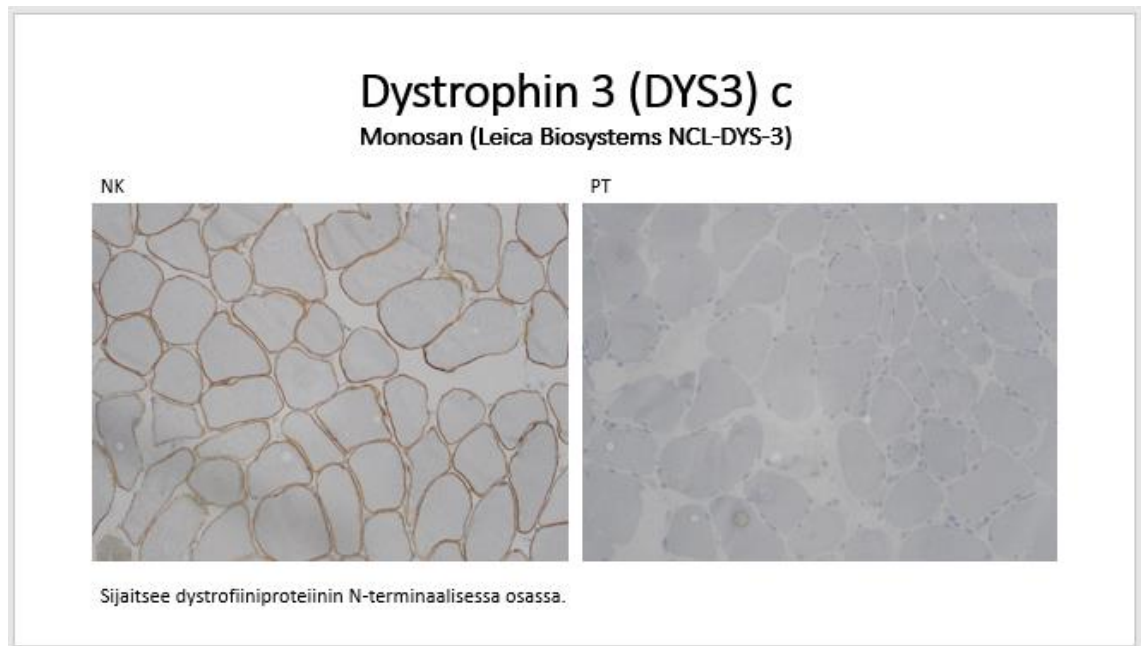
Dystrophin 1 (DYS1)	Sijaitsee dystrofiiniproteiinin ROD-domainissa.
Dystrophin 2 (DYS2)	Sijaitsee dystrofiiniproteiinin C-terminaaliosassa.
Dystrophin 3 (DYS3)	Sijaitsee dystrofiiniproteiinin N-terminaaliosassa.
Dysferlin	Sarkolemmen Ca ²⁺ kanavaproteiini.
Emerin	Perinukleaaritilan proteiini.
FATZ1	Z-levyn proteiini.
FATZ2	Z-levyn proteiini.
GRP78 (BiP)	Kaperoniproteiini, jota esiintyy endoplasmakalvostossa, tumassa, sytoplasmassa sekä mitokondrioissa.
HLA-Class	Havaitaan tietyissä lihassairauksissa.
LAMP2	Glykolysoitunut sarkolemmen proteiini.
LC3B	Sytoplasmassa sijaitseva autofagosomien muodostukseen osallistuva proteiini, joka akkumuloituu epänormaalisti sairaassa lihaksessa.
MAC	Makrofageille spesifinen proteiini.
Myosin Heavy Chain Developmental (MHCd)	Sytoplasmassa sijaitseva proteiini, jota esiintyy alkio- ja sikiökaudella sekä lihassyiden regeneroituessa.
Myosin Heavy Chain Neonatal (MHCn)	Sytoplasmassa sijaitseva proteiini, joka häviää normaalisti sikiökauden jälkeen.
MXA	Tumassa ja sytoplasmassa sijaitseva proteiini. Yhdistetty JDM:ään.
MHCS+A4	MHCS värjää hitaat syytyypit ruskeaksi. A4.74 värjää nopeat syytyypit IIA & IIX ja hybridisyyt.
Myotilin	Z-levyn rakenneproteiini.
NOS1	Sarkolemmen alla sijaitseva proteiini, joka on yhteydessä dystrofiini-glykoproteiinikompleksiin.
P62	Autofagosomireseptori, jota esiintyy useissa lihassyiden rakenteissa. Sairaassa lihaksessa akkumuloituu epänormaalisti.
Ryanodine Receptor (RYR1)	Sarkolemmen Ca ²⁺ -kanavaproteiini.
Serca1	Nopeissa tyypin II-lihassyissä sijaitseva proteiini.
Serca2	Hitaissa tyypin I-lihassyissä sijaitseva proteiini.

SMI-31	Sairaassa lihaksessa akkumuloituu mm. reunusrakkuloihin. IBM-markkeriproteiini.
STIM1	Sarkolemman kalsiumin säätelyyn osallistuva proteiini.
TDP-43	DNA tai RNA-sidoksen proteiini, joka säätelee transkriptiota ja silmukoitumista. Sairaassa lihaksessa akkumuloituu epänormaalisti.
Telethonin	Z-levyn proteiini.
Tropomyosin	Aktiinifilamenttiin kiinnittynyt proteiini.
TroponinT	Nopeiden lihassyiden aktiinifilamenteissa esiintyvä proteiini.
Ubiquitin	Osallistuu proteiinien muokkaukseen.
VCP	Syttoplasmassa esiintyvä proteiini.

7.2 Tuotos

Opinnäytetyön tuotoksena on kuvakansio lihasten immunohistokemiallisista värjäyksistä. Powerpoint-muotoon tuotetussa kuvakansiossa on yhteensä 44 diaa, joista ensimmäinen dia on kansilehti ja viimeinen lähdeluettelo. Kansilehti sisältää kuvakansion nimen, joka on Lihasten immunohistokemialliset värjäykset sekä kuvaamis ajankohdan, tilaajan ja tekijöiden nimet. Lähdeluettelo sisältää kuvakansiossa käytetyt lähteet, jotka ovat Solubiologi Mikaela Lindforsin henkilökohtainen tiedonanto, Bioanalyttikko Satu Luhtaselan henkilökohtainen tiedonanto, Palmion & Uddin (2015) kirjoittama artikkeli ”Lihastaudit” teoksessa Neurologia (Duodecim), NMP- laboratorion vasta-ainelista ja vasta-aineiden datasheetit sekä UniProt proteiini-tietokanta.

Kuvakansiossa on esitelty yhteensä 42 eri immunohistokemiallista värjäystä. Jokaisesta värjäyksestä on kaksi kuvaa, normaalikontrolli ja patologinen näyte, jotka ovat esitetty rinnakkain samalla dialla (kuva 18). Kuvat ovat otettu joko 10- tai 20-kertaisella suurennoksella, joita ei ole ilmoitettu erikseen. Jokaisen dian otsikkona on värjäyksen nimi, joka on johdettu pääasiassa värjättävän proteiinin nimestä. Lisäksi jokaisesta värjäyksestä on ilmoitettu käytetyn vasta-aineen konsentraatio, värjäyksessä käytettävän vasta-aineen valmistaja ja tieto siitä missä värjättävän proteiinin pitäisi sijaita, esimerkiksi sarkolemalla, z-levyssä tai sytoplasmassa.



KUVA 18. Kuvassa Dystrophin 3 (DYS3)- värjäys. Vasemmanpuoleinen kuva on normaalikontrolli ja oikeanpuoleisessa kuvassa patologinen muutos eli värjättävän proteiinin puutos. Värjäyksen konsentraatio (c) on jätetty pois toimeksiantajan toiveesta. (Kuva: Sanni Nieminen & Menna Sirola 2016)

8 POHDINTA

Tämän opinnäytetyö tarkoituksena oli laatia sähköisessä muodossa oleva kuvankansio tutkimuskeskuksessa käytössä olevista immunohistokemiallisista lihasbiopsiavärjäyksistä. Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda helppokäyttöinen ja käytännönläheinen tukimateriaali tutkimuskeskuksen käyttöön, jonka avulla pyritään ylläpitämään värjäystulosten laatua jokapäiväisessä työssä. Kuvakansion sisältö on toteutettu toimeksiantajan tarpeiden ja toiveiden mukaisesti.

Opinnäytetyöprosessi on ollut mielestämme erittäin haastava, mutta samanaikaisesti erittäin antoisa ja opettavainen. Suurimpana haasteena on ollut ehdottomasti opinnäytetyön aihe kokonaisuudessaan. Lihastaudit olivat meille kummallekin alun perin tuntematon aihe, joista meillä ei ollut lähestulkoon mitään tietoa ennen opinnäytetyön aloitusta. Myös immunohistokemia loi meille aiheena paljon haasteita, koska opetussuunnitelman mukainen immunohistokemian kurssi alkoi koulussa vasta toukokuussa 2016, jolloin opinnäytetyömme oli käytännössä jo valmis. Tiedonhankintataitomme ovat kehittyneet prosessin aikana ja olemme oppineet paljon vieraskielistä ammattisanastoa.

Lihastautien tutkimus on keskitetty Suomessa Tampereen yliopiston Lihastautien tutkimuskeskukseen. Lihastaudit ovat aiheena erittäin spesifi, joten aiheeseen liittyvä kirjallisuus on suurimmaksi osaksi englanniksi ja lähteiden tuoreus vaihtelee suuresti. Englanninkielisen tekstin lukeminen on vienyt paljon aikaamme, mutta nyt työn valmistuttua olemme tyytyväisiä tekemäämme työmäärään. Olemme korostaneet opinnäytetyösämme lähteiden luotettavuutta käyttämällä rinnakkaislähteitä niin paljon kuin mahdollista sekä arvioimalla kriittisesti eri lähteiden luotettavuutta, minkä ansiosta työmme raporttiosuus on mielestämme luotettava. Olemme tarkistuttaneet myös opinnäytetyömme raporttiosuuden toimeksiantajallamme.

Pidämme myös opinnäytetyön tuotosta, kuvakansiota erittäin luotettavana. Kuvakansioon kuvatut lihasbiopsiavärjäykset ovat joko ammattilaisten tai meidän tekemiä. Tekemämme värjäykset ovat tehty alusta alkaen ammattilaisen valvonnassa ja tarkasti työohjeita noudattaen. Lisäksi jokaisessa värjäyksessä on käytetty mukana normaalikontrollia, mikä lisää värjäysten luotettavuutta. Koska näytemateriaali on potilaslähtöistä ja potilaiden diagnoosit ovat jo selvinneet, on ollut alusta saakka selvää, mitä värjäyksestä pitäisi löytyä.

Kuvakansio on hyväksytetty työn aikana useampaan kertaan sekä värjäyksiin perehtyneellä bioanalytikolla ja solubiologilla, joten voimme pitää lopputulosta erittäin luotettavana. Saimme myös pyynnöstämme palautetta kuvakansiosta toimeksiantajaltamme. Palautteen perusteella kuvankansioon oltiin tyytyväisiä ja se on tullut jo toimeksiantajan tarkoituksenmukaiseen käyttöön. Jatkotutkimusaiheeksi ehdotimme värjäystuloksiin vaikuttavien artefaktujen kartoitusta ja keinoja niiden vähentämiseksi. NMP-laboratorion värjäyslaite saattoi aiheuttaa laseille todellista kertymää muistuttavaa artefaktia, joka saattoi vaikeuttaa värjäysten tulkintaa. Syytä tähän ei tiedetty, ja tätä esiintyi värjäyksissä suhteellisen usein.

Prosessin aikana olemme törmänneet muutamiin eettisiin kysymyksiin. Aihe nousi pinnalle ensimmäistä kertaa, kun olimme katsomassa lihasbiopsian ottoa potilaalta. Työn kannalta olisi ollut suotavaa, että olisimme kuvanneet biopsianottotilanteen. Eettisistä syistä kuitenkin päätimme, että potilasta kunnioittaen emme kuvaa tilannetta, vaan päädymme ottamaan kuvan ainoastaan konkotomista. Myös kuvakansiossa käytetyt värjäykset on tehty oikeista potilasnäytteistä, joten meille on ollut alusta saakka selkeää, että potilastiedot eivät saa levitä missään vaiheessa ja tästä olemme pitäneet tiukasti kiinni.

Koska työllämme on toimeksiantaja, noudatamme luonnollisesti toimeksiantajan toivetta työn julkaisuun ja levitykseen liittyen. Toimeksiantajan toiveesta emme julkaise NMP-laboratorion työohjeita, ja siksi niistä ei ole liitteitä saatavilla. Samasta syystä emme myöskään julkaise kuvakansiota. Värjäyksissä käytetyt vasta-ainekonsentraatiot pysyvät myös salassa. Opinnäytetyöseminaarissa saamme kierrättää luokassa kuvakansion, josta on poistettu värjäysten konsentraatiot. Pidämme myös seminaarissa huolen, että kuvakansio palautuu tekijöilleen, eikä sitä kopioida.

Lopuksi haluaisimme vielä kiittää toimeksiantajaamme. Työn tekeminen on ollut alusta alkaen erittäin mielekäästä, mikä on suurelta osin toimeksiantajaamme ansiota. Ohjaus työn tekemiseen on ollut erittäin hyvää ja joustavaa, mikä näkyy esimerkiksi siinä, että kuvakansion teko paikan päällä on mahdollistunut koulun vapaajaksojen mukaan. Ohjeet ovat olleet erittäin selkeät, mutta olemme saaneet myös itse vaikuttaa moniin asioihin sekä ehdottaa ideoita kuvankansioon liittyen. Meille on oltu alusta saakka ystävällisiä ja voimme sanoa, että olemme tunteneet itsemme välillä jopa työryhmän jäseniksi. Ilman laadukasta ohjausta, työmme ei olisi tavoitteidemme mukainen.

LÄHTEET

BenchMark GX. 2013. Ventana Medical Systems, Inc. file:///D:/BMK_GX_Brochure_web.pdf

Buchwalow, I. & Böcker W. 2010. Immunohistochemistry: Basics and Methods. Heidelberg: Springer.

Carson, F. & Hladik, C. 2009. Histotechnology, A Self-Instructional Text. 3. edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press.

Collin, H. 2010. Lihastautien geenisytyt selville. Tampereen yliopisto; aikalainen. Luettu 23.05.2016. <http://aikalainen.uta.fi/2010/11/05/lihastautien-geenisytyt-selville/>

The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Connective tissue wrappings of skeletal muscle (Figure 9.1a). Luettu 09.08.2016. <http://www.tarleton.edu/departments/anatomy/musclepix2.html>

Delves, P. J. 2014. Human Leukocyte Antigen (HLA) System. Luettu 27.07.2016. <https://www.merckmanuals.com/professional/immunology-allergic-disorders/biology-of-the-immune-system/human-leukocyte-antigen-hla-system>

Dubowitz, V. & Sewry, C. 2007. Muscle biopsy. 3. edition. China: Saunders Elsevier.

Eskelinen, S. 2016. Kreatiiniikinaasi (P-CK). Terveyskirjasto: Kustannus Oy Duodecim. Luettu 01.08.2016. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03141

Fimlab Laboratoriot Oy. 2014. Lihasnäytteen jäädytys.

Hakala, J. 2004. Opinnäytetyöopas ammattikorkeakouluille. 2. painos. Tampere: Tammer-Paino Oy.

HUSLAB. 2016. Aldolaasi Seerumista. Luettu 01.08.2016. <http://huslab.fi/ohjekirja/1032.html>

Hus Kuvantaminen. 2013. Kliininen rasituskoee, spiroergometria laktaattinäyttein. Luettu 08.08.2016. <http://huslab.fi/ohjekirja/18601.html>

HUS Kuvantaminen. 2010. Lihasbiopsia konkotomilla. Luettu 10.08.2016. <http://huslab.fi/ohjekirja/4927.html>

HUS Kuvantaminen. 2015. Lihasbiopsia konkotomilla ja siihen valmistautuminen. Luettu 09.08.2016. http://huslab.net/hus_kuvantaminen/yleisohjeet/potilasohjeet/kliininen_neurofysiologia/suomeksi/lihasbiopsia_konkotomilla.pdf

Jokela, M. & Udd, B. 2014. Lihastautiepäily – kuinka tutkin ja diagnosoin?. Suomen Lääkärilehti 45/2014. <http://docplayer.fi/4285975-Lihastautiepaily-kuinka-tutkin-ja-diagnosoin.html>

Kauranen, K. 2014. Lihas –rakenne, toiminta ja voimaharjoittelu. Tampere: Tammerprint Oy.

Korpela, M., Löfberg, M., Pihko, H., Lönnqvist, T., Paetau, A., Salmi, T., Lamminen, A., Kock, T. & Kiuru-Enari, S. 2008. Neuromuskulaaritautien diagnostiikka ja hoitoketjut. Suomen lääkärilehti 37/2008. <http://docplayer.fi/1724105-Neuromuskulaarisairauksiin-luetaan-varsin-laaja-neuromuskulaaritautien-diagnostiikka-ja-hoitoketjut-laaketiede-kat-sausartikkeli.html>

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

Leppäluoto, J., Kettunen, R., Rintamäki, H., Vakkuri, O., Vierimaa, H. & Lätti, S. 2013. Anatomia ja fysiologia, Rakenteesta toimintaan. 3. painos. Helsinki: Sanoma Pro.

LIHASBIOPSIAN (4057 M-PAD) LÄHETYS TAYSIN PÄÄSAIRAALAN ULKO-PUOLELTA. Pirkanmaansairaanhoitopiiri.

Lindfors, M. Solubiologi, FM. 2016. Immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjäykset lihastautien diagnostiikassa. Sähköpostiviesti. mikaela.linfors@staff.uta.fi. Luettu 30.05.2016.

Luhtasela, S. Bioanalyytikko. 2015. Keskustelu 09.10.2015.

Luhtasela, S. Bioanalyytikko. 2016. Immunohistokemialliset lihasbiopsiavärjäykset lihastautien diagnostiikassa. Sähköpostiviesti. satu.luhtasela@staff.uta.fi. Luettu 20.07.2016.

Luhtasela, S., Kojo, H-L. & Kariniemi, M. 2014. Immunohistokemialliset värjäykset immunoautomaatilla. TaY:n Neuromuskulaarimolekyylipatologian laboratorion työohje. Julkaistu 11.06.2013. Päivitetty 24.04.2014.

Lumme, R., Leinonen, R., Leino, M., Falenius, M. & Sundqvist, L. 2006. Monimuotoinen/ toiminnallinen opinnäytetyö. Luettu 27.4.2016. <http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojak-sot/030906/1113558655385/1154602577913/1154670359399/1154756862024.html>

LC3B (D11) XP® Rabbit mAb. 2015. Cell Signaling Technology, Inc. Julkaistu 2015. Päivitetty 14.01.2016. Luettu 01.08.2016. <https://media.cellsignal.com/pdf/3868.pdf>

Lihastautiliitto ry. a. Diagnoosit. Luettu 30.05.2016. <http://www.lihastautiliitto.fi/fi/Diagnoosit>

Lihastautiliitto ry. b. Lihastaudit. Luettu 30.05.2016. <http://www.lihastautiliitto.fi/fi/Lihastaudit>

Mahmood, T. & Yang, P. 2012. Western Blot: Technique, Theory and Trouble Shooting. Luettu 26.04.2016. <http://www.najms.org/article.asp?issn=1947-2714;year=2012;volume=4;issue=9;page=429;epage=434;aulast=Mahmood>

Mäkinen, M. & Stenbäck, F. 2012. Immunohistokemiallinen diagnostiikka. Teoksessa Mäkinen, M., Carpen, V., Kosma, V., Lehto, V. & Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Duodecim.

Penttilä, I. & Pulkki, K. 2010. Sydän- ja luurankolihas. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede, Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Myosin Heavy Chain (developmental). Leica Biosystems Newcastle Ltd. Datasheet. Luettu 10.08.2016. https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/mhcd.pdf

Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Myosin Heavy Chain (neonatal). Leica Biosystems Newcastle Ltd. Datasheet. Luettu 10.08.2016. https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/mhcn.pdf

NMPL_ihc_Vasta-ainelista 25042016. 2016. Tampereen yliopisto, lihastautien tutkimuskeskus.

Palmio, J. & Udd, B. 2015. Lihastaudit. Teoksessa Soynila, S., Kaste, M., Somer, H. & Alaranta, H. (toim.) Neurologia. Oppiportti: Duodecim. Luettu 01.05.2016.

Isohanni, P. & Pihko, H. 2014. Neuromuskulaarisairaudet. Teoksessa Pihko, H., Haataja, L. & Rantala, H. (toim.) Lasten neurologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Pirkanmaan sairaanhoitopiiri. 2015. Lihاسبiopsian tutkimukset. Luettu 08.08.2016. http://www.pshp.fi/fi-FI/Ohjeet/Laheteohjeet_ja_konsultaatiot/Lihastautien_erityisdiagnostiikka_lihas%2845591%29

Pirkanmaan sairaanhoitopiiri. 2016. Lihastautien erityisdiagnostiikka. Luettu 16.07.2016. http://www.pshp.fi/fi-FI/Palvelut/Neuroalat/Neurologia/Lihastautien_erityisdiagnostiikka

Pocock, G., Richards, C. D. & Richards, D. A. 2013. Human Physiology. 4. edition. China: C&C Offset Printing Co. Ltd.

Protocol #505: Lihastautien IHC. 2008. Procedure: BMK ultraView DAB Par, Par, BenchMark IHC/ISH Staining Module.

Raheem, O. 2013. Jääleikkeiden leikkaaminen lihasnäytteestä. Julkaistu 20.11.2009. Päivitetty 11.06.2013.

Raheem, O., Suominen, T., Hackaman, P., Vihola, A., Auranen, M., Kalimo, H., Mahjneh, I., Kärppä, M., Haapasalo, H. & Udd, B. 2006. Hartia-lantiodystrofioiden molekyyli-genetiikka Suomessa. Duodecim. 17/2006. <http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo95981.pdf>

Renshaw, S. (ed.) 2007. Immunohistochemistry. 1. Edition. Oxfordshire; Scion Publishing Limited.

Sand, O., Sjaastad, Q., Haug, E. & Bjålie, J. 2011. Ihminen Fysiologia ja anatomia. 1. painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Sandström, M. & Ahonen, J. 2011. Liikkuva ihminen – aivot, liikuntafysiologia ja sovellettu biomekaniikka. 1. painos. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy.

Sillanpää, M., Herrgård, E., Iivanainen, M., Koivikko, M. & Rantala, H (toim.) 2004. Lastenneurologia. 2. painos. Helsinki: Duodecim.

Suvarna, S. K., Layton, C. & Bancroft, J. D. 2013. Bancroft`s Theory and Practice of Histological Techniques. 7. edition. China: Churchill Livingstone Elviser.

Taylor, C. R. & Rudbeck, L. (ed.) 2013. Education Guide, Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. Dako.

ThermoFisher scientific. 2015. Superfrost™ Plus and ColorFrost™ Plus Microscope Slides. Luettu 05.08.2016. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4951PLUS4>

TYKSLAB. 2016. M-Lihaksen histologinen tutkimus. Luettu 05.08.2016. <https://webohjekarja.mylabservices.fi/TYKS/4057.html>

ultraView Universal DAB Detection Kit. 2011. Ventana Medical Systems, Inc. Kittiohje. http://productlibrary.ventanamed.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=760-50021090EN

ultraView Universal DAB Detection Kit. 2009. Ventana Medical Systems, Inc. [file:///D:/ultraViewDABbrochure%20\(2\).pdf](file:///D:/ultraViewDABbrochure%20(2).pdf)

UniProtKB. 2016a. P02511 (CRYAB_HUMAN). Julkaistu 21.07.1986. Päivitetty 06.07.2016. Luettu 01.08.2016. <http://www.uniprot.org/uniprot/P02511>

UniProtKB. 2016b. P03886 (NU1M_HUMAN). Julkaistu 21.07.1986. Päivitetty 06.07.2016. Luettu 01.08.2016. <http://www.uniprot.org/uniprot/P03886>

UniProtKB. 2016c. P21912 (SDHB_HUMAN). Julkaistu 01.03.1991. Päivitetty 06.07.2016. Luettu 01.08.2016. <http://www.uniprot.org/uniprot/P21912>

UniProtKB. 2016d. P55072 (TERA_HUMAN). Julkaistu 01.10.1996. Päivitetty 06.07.2016. Luettu 01.08.2016. <http://www.uniprot.org/uniprot/P55072>

Vasta-aine Datasheetit. Tampereen yliopisto, Lihastautien tutkimuskeskus.

Vanhatalo, S. & Soinila, S. 2015. Elektroneuromyografia. Teoksessa Soinila, S., Kaste, M., Somer, H. & Alaranta, H. (toim.) Neurologia. Oppiportti: Duodecim. Luettu 01.05.2016.

Vilka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. 1. painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.