

Suvi Maijala ja Katarine Weckström

# γH2AX:n ja pilkottu kaspasasi-3:n immunohisto- kemiallisten värjäysten optimointi eturauhasku- doksessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka

Sosiaali- ja terveysala

Opinnäytetyö

24.10.2013

Tekijät Otsikko  Sivumäärä Aika	Suvi Maijala ja Katarine Weckström $\gamma$ H2AX:n ja pilkottu kaspasasi-3:n immunohistokemiallisten värjäysten optimointi eturauhaskudoksessa 61 sivua 24.10.2013
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Vanhempi tutkija Taija af Hällström Lehtori Hannele Pihlaja
<p>Suoritimme opinnäytetyömme Helsingin urologisessa biopankissa (HUB) Suomen molekyyli lääketieteen instituutissa (FIMM). HUB on biopankkihanke, joka on samalla tutkimus- ja kehittämissuunnitelma. HUB:n tavoitteena on kehittää urologisten syöpien diagnostiikkaa ja hoitoa. Opinnäytetyömme liittyi tutkimus- ja kehittämissuunnitelmaan, jossa tarkoituksena on kehittää yksilöllistä lääkitystä eturauhassyövän hoitoon.</p> <p>Opinnäytetyössä optimoimme <math>\gamma</math>H2AX:n (mittaa DNA-vauriota ja solukuolemaa) sekä pilkottu kaspasasi-3:n (mittaa solukuolemaa) vasta-ainepitoisuuksia kromogeenipohjaisille immunohistokemiallisille värjäysmenetelmille. Näiden vasta-aineiden avulla pystytään mittaamaan sädetyksen ja lääkeaineiden vaikutusta eturauhaskudokseen.</p> <p>Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä Suomessa. Eturauhassyövän hoitoon liittyy suuria haasteita, koska eturauhassyöpä voi vaihdella harmittomasta jopa tappavaan. Tutkimus- ja kehittämissuunnitelman mielenkiinnon kohteena on erityisesti eturauhassyövän muoto (kastraatioresistentti) johon, ei ole olemassa parantavia hoitoja.</p> <p>Optimoimme <math>\gamma</math>H2AX ja pilkottu kaspasasi-3 -vasta-aineille manuaalivärjäyksen kahdelle eri kudokskuljettimelle sekä <math>\gamma</math>H2AX:lle automaattivärjäyksen kahdelle eri kudokskuljettimelle. Optimoinnin perusteella jokaiselle <math>\gamma</math>H2AX-värjäysmenetelmälle tuli erilainen vasta-ainepitoisuus ja pilkottu kaspasasi-3 -värjäysmenetelmille tuli molemmille sama vasta-ainepitoisuus. Optimoimamme vasta-ainepitoisuudet olivat paljon laimeammat kuin FIMM:ssä aiemmin käytetyissä menetelmissä. Tämän ansiosta immunohistokemiallisten värjäysten kustannukset pienenevät FIMM:ssä. Jatkossa on tarkoitus yhdistää <math>\gamma</math>H2AX ja pilkottu kaspasasi-3 -vasta-aineet niin, että nämä kaksi vasta-ainetta voidaan tulkita samalta lasilta immunofluoresenssimenetelmällä.</p>	
Avainsanat	immunohistokemia, kromogeeni, streptavidini-biotiini -menetelmä, polymeeritekniikka, $\gamma$ H2AX, pilkottu kaspasasi-3

Authors Title Number of Pages Date	Suvi Maijala and Katarine Weckström The Optimization of $\gamma$ H2AX and Cleaved Caspase-3 Immunohistochemical Staining Methods in Prostate Tissue 61 pages 24 October 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Taija af Hällström, Senior Researcher Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>We conducted our study at the Helsinki Urological Biobank (HUB) at the Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM). HUB is a biobank project which focuses on sample collection and research and development projects. The purpose of HUB is to develop the diagnostics and treatments for urological cancers. Our study was part of a HUB research and development project, the goal of which was to develop personalized medicine for prostate cancer.</p> <p>The aim of our study was to optimize <math>\gamma</math>H2AX (DNA damage and apoptotic marker) and cleaved caspase-3 (apoptotic marker) antibody staining for chromogen based immunohistochemistry. The effect of medicines and irradiation treatments for prostate tissue can be measured with immunohistochemical staining based on these antibodies.</p> <p>Prostate cancer is the most common cancer type among men in Finland. Prostate cancer poses a real clinical challenge since the nature of prostate cancer may vary from a harmless to even a deadly disease. The special area of interest for the research and development project is a (castration resistant) form of prostate cancer, to which no known curative treatments exist.</p> <p>In this study, we optimized a manual staining protocol for the <math>\gamma</math>H2AX and the cleaved caspase-3 antibody for tissues that had been processed with two different types of tissue processing protocols. In addition, we optimized the <math>\gamma</math>H2AX automatic staining for tissues that had been processed with two different types of tissue staining protocols.</p> <p>Based on the optimization for each of the <math>\gamma</math>H2AX staining methods, distinct antibody levels were selected. For both of the cleaved caspase-3 staining methods, the same antibody levels were selected. The antibody concentrations originally used proved to be much stronger than the ones optimized in the study. As a conclusion, this will lead to economic savings at FIMM. In future, the objective will be to combine the <math>\gamma</math>H2AX and the cleaved caspase-3 antibodies so that these two antibodies may be read on the same tissue slide with the immunofluorescence method.</p>	
Keywords	immunohistochemistry, chromogen, streptavidin-biotin method, polymer chain technique, $\gamma$ H2AX, cleaved caspase-3

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Eturauhanen	2
2.1	Eturauhassyöpä	2
2.2	Sädetys	4
3	Histologiset menetelmät	4
3.1	Fiksaatio	5
3.2	Kudoskuljetus	6
3.2.1	Perinteinen kudoskuljetus	6
3.2.2	Mikroaaltokudoskuljetus	7
3.3	Valaminen ja leikkaaminen	8
4	Immunohistokemialliset menetelmät	9
4.1	Antigeeni ja vasta-aineet	9
4.2	Suora ja epäsuora immunohistokemiallinen menetelmä	10
4.3	(Strept)avidini-biotiini -menetelmä	10
4.4	Polymeeritekniikka	12
4.5	Piparjuuriperoksidaasi	12
4.6	DAB ja hematoksyliini	13
4.7	Antigeenin paljastus	13
4.8	Taustavärjäytyminen	14
5	$\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspasi-3	15
5.1	$\gamma$ H2AX	15
5.2	Pilkottu kaspasi-3	17
6	Näytteet	19
6.1	Kontrollit	20
6.2	Näytteiden laadunvalvonta	21
7	Värjäykset	22
7.1	Kudosnäytteiden valmistaminen värjäystä varten	23
7.2	Värjäysten eteneminen	24
7.3	Pesut	28
8	Tulokset	29

8.1	γH2AX HUSLAB manuaalivärjäys	30
8.2	γH2AX HUSLAB automaattivärjäys	33
8.3	γH2AX FIMMlab manuaalivärjäys	37
8.4	γH2AX FIMMlab automaattivärjäys	39
8.5	γH2AX tulosten yhteenveto	42
8.6	Pilkottu kaspasi-3 HUSLAB manuaalivärjäykset	43
8.7	Pilkottu kaspasi-3 FIMMlab manuaalivärjäykset	47
8.8	Pilkottu kaspasi-3 tulosten yhteenveto	49
9	Tulosten tarkastelu	50
10	Pohdinta	51
10.1	Tulosten luotettavuus	52
10.2	Eettisyys	53
10.3	Ammatillinen kehittyminen	53
10.4	Jatkotutkimukset	54
	<b>Lähteet</b>	<b>55</b>

## 1 Johdanto

Suoritimme opinnäytetyömme Helsingin urologisessa biopankissa (HUB) Suomen molekyyliääkätieteen instituutissa (FIMM). HUB on yhteistyöhanke FIMM:n, HUS:n (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri) ja HYKS:n (Helsingin Yliopistollinen keskussairaala) urologian klinikan välillä. Biopankkiin kerätään potilasnäytteitä urologisten syöpien tutkimusta varten niin suomalaisille kuin kansainvälisille tutkijoille ja tutkimusryhmielle. Näytteiksi kerätään veri- ja virtsanäytteitä, tuoreena pakastettuja kudoksenäytteitä, näytteisiin liittyviä tietoja ja potilaiden kliinisiä tietoja. Tarkoituksena on kehittää diagnostisia menetelmiä, syöpähoitoja sekä yksilöityä lääkehoitoa urologisia syöpiä sairastaville potilaille. HUB:n biopankkitoimintaan kuuluu myös erilaisia teknologiakehitysprojekteja. Opinnäytetyömme liittyy projektiin, jossa on kehitelty uusi viljelymenetelmä eturauhasen kudostenleikkeille. Näitä viljeltyjä eturauhaskudostenleikkeitä on sädetetty ja kasvatettu tutkimuskäyttöä varten.

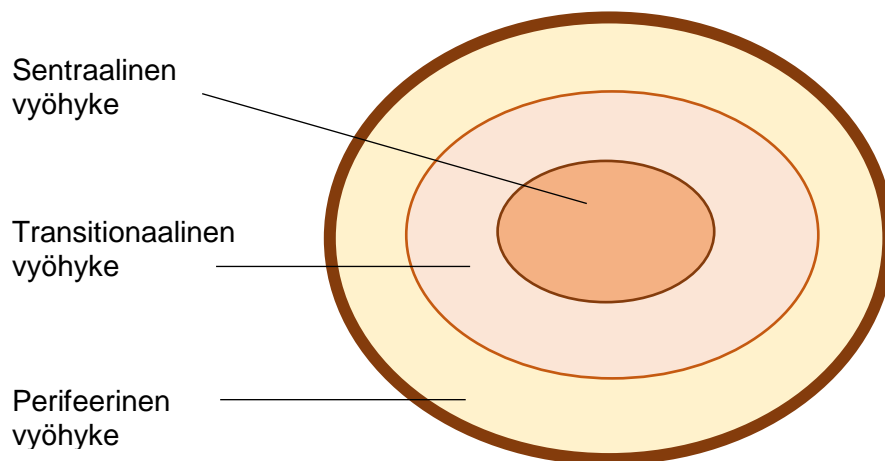
Opinnäytetyön aiheena on optimoida eturauhassyövän immunohistokemiallisia värjäyksiä immunoentsyymimenetelmillä. Opinnäytetyössämme käytimme kahta eri menetelmää ja kahta eri vasta-ainetta. Kokeellinen osuus  $\gamma$ H2AX -vasta-aineella tehtiin sekä manuaali- että automaattivärjäyksellä ja pilkottu kaspasi-3 -vasta-aineella ainoastaan manuaalisesti. Manuaalivärjäyksessä käytettiin (strept)avidini-biotiini -menetelmää ja automaattivärjäyksessä käytettiin polymeeritekniikkaa. Tehtävänä oli selvittää miten kaksi eri kudostenkuljetusprosessia vaikuttivat värjäytymiseen sekä  $\gamma$ H2AX- että pilkottu kaspasi-3 -vasta-aineilla. Lisäksi selvitettiin automaattivärjäyksen ja manuaalivärjäyksen vaikutus värjäytymisen voimakkuuteen.  $\gamma$ H2AX mittaa DNA-vauriota ja solukuolemaa. Pilkottu kaspasi-3 taas mittaa solukuolemaa.

Optimointia tarvittiin ensinnäkin siksi että, FIMM:ssä tutkittavat näytteet on ennen kudostenkuljetusta HUSLAB:ssa (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorio) ja nyt FIMM:iin on tullut uusi oma kudostenkuljetin. Toiseksi FIMM:ssä on vaihdettu anti-geeninpaljastuksessa käytetty mikroaaltouuni uuteen, eri menetelmällä toimivaan, laitteeseen. Kolmanneksi manuaalivärjäyksellä tehtyjä  $\gamma$ H2AX-värjäyksiä aletaan tehdä automaattivärjäyksellä.

Opinnäytetyön ohjaajina toimivat vanhempi tutkija Taija af Hällström (FT) ja lehtori Hannele Pihlaja (TtM) Metropolia Ammattikorkeakoulusta. Taija af Hällström toimii tutkijana Olli Kallioniemen tutkimusryhmässä, jossa yhtenä tutkimuksen osa-alueena on yksilöidyt syöpähoitot. Hän vastaa HUB:ssa teknologian kehityksestä ja tekee perustutkimusta eturauhassyövän alalla.

## 2 Eturauhanen

Aikuisen miehen eturauhanen painaa noin 20 grammaa. Se ympäröi virtsaputkea ja virtsarakon kaulaa (Kujala 2012: 800). Eturauhanen jaetaan anatomisiin vyöhykkeisiin. Nämä ovat tärkeitä eturauhasen patologisten muutosten osalta. Vyöhykkeet nimetään sentraaliseksi, transitionaaliseksi ja perifeeriseksi vyöhykkeiksi (kuvio 1). Jopa 80 % eturauhassyövästä saa alkunsa perifeerisestä vyöhykkeestä. (Kierszenbaum – Tres 2012: 625.) Kiveksissä tuotetut miessukupuolihormonit säätelevät eturauhasen kehitystä ja kasvua. Eturauhanen suurenee iän myötä. Eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvu on yleistä. Eturauhasen koko ei kuitenkaan korreloi eturauhassyövän kanssa. (Kujala 2012: 800–801.)



Kuvio 1. Eturauhasen poikkileikkaus (mukaillen Kierzenbaum – Tres 2012: 626).

### 2.1 Eturauhassyöpä

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä Suomessa (Eturauhassyöpä 2007). Ikä on tärkein riskitekijä eturauhassyövän osalta. Noin kymmenen prosenttia miehistä sairastuu

tuu eturauhassyöpään. Keskimääräinen sairastumisikä on yli 70 vuotta. (Kellokumpu-Lehtinen – Joensuu – Tammela 2013: 562.) Eturauhassyövän hoitoon liittyy suuria haasteita, koska eturauhassyöpä voi olla harmiton tai jopa tappava. Eturauhassyövän ennuste voi olla hyvä myös ilman hoitoa, jos syöpä on erilaistunut, paikallinen ja sen koko on pieni. (Mirtti – Rannikko 2012.) Toisaalta on tärkeä tunnistaa hoitoa vaativat aggressiiviset eturauhassyövän muodot, jotka saattavat lähettää etäpesäkkeitä. Keskimääräinen elinikä on vain 2–3 vuotta metastoituneessa eturauhassyövässä. (Eturauhassyöpä 2013.)

Noin 98 % maligneista eturauhassyövästä on adenokarsinomia, eli lähtöisin rauhasepiteelistä. Eturauhassyövät luokitellaan Gleason luokituksen mukaan. Gleason luokitus kuvaa eturauhassyövän kliinisesti merkitseviä biologisia ominaisuuksia ja riskitasoja, asteikolla 1–5. Asteikossa numero 1 tarkoittaa lieviä muutoksia rauhasrakenteessa ja numero 5 tarkoittaa täysin järjestäytymätöntä ja invasiivista syöpätyyppiä. Patologi tarkastaa kasvaimen yleisimmän ja toiseksi yleisimmän tyyppin ja antaa lausunnon syövän Gleason luokasta (2–10). (Kellokumpu-Lehtinen ym. 2013: 563.)

Eturauhassyöpä todetaan usein PSA-mittauksen avulla (prostataspesifinen antigeeni). Epäiltäessä eturauhassyöpää tehdään usein transrektaalinen kaikukuvaus, josta saadaan selville eturauhasen ja transitiovyöhykkeen koko. Transrektaalisesta kaikukuvauksen avulla pystytään ottamaan koepalat toivotuista kohdista. (Kellokumpu-Lehtinen ym. 2013: 563–564.) Tutkimuksen yhteydessä otetaan yleensä 10–12 koepalaa, joista selviää syövän sijainti ja laatu (Eturauhassyöpä 2007). Eturauhassyövän hoito määräytyy muun muassa sen mukaan onko syöpä pysynyt eturauhasen sisällä, kasvanut kapselista ulos tai metastoitunut muualle kehoon. Etäpesäkkeet leviävät yleensä luustoon tai paikallisiin imusolmukkeisiin. (Lukkarinen – Kunnamo – Aho 2004.)

Androgeenit (miessukupuolihormonit) ovat välttämättömiä eturauhassyövän kehittymiselle (Tammela 2013). Paikallisena pysyneessä eturauhassyövässä paras elinaikaa pidentävänä hoito on eturauhasen poistoleikkaus tai sädehoito. Jos syöpä on kasvanut ulos kapselistaan, tai se on metastoitunut alueellisiin imusolmukkeisiin, hoitona käytetään hormonihoitoa. Hormonihoito perustuu useimmiten kastraatioon. Kastratio pystytään tekemään joko poistamalla kiveskudos kirurgisesti tai lääkkeillä. Tällöin testosteronipitoisuus laskee. (Kellokumpu-Lehtinen ym. 2013: 571–575.)



Eturauhassyöpä luokitellaan kastroatioresistentiksi, jos syövän kasvu etenee, vaikka seerumin testosteronipitoisuus on kastroatiotasolla. Kastroatioresistenttiin eturauhassyöpään ei ole varsinaista parantavaa hoitoa. Hormonihoito ja sädetys sekä lääkehoito tehoavat osalla potilailla jonkin aikaa. Kuitenkin suurimmalla osalla potilaista hoitovaste heikkenee ja tauti uusiutuu. (Kellokumpu-Lehtinen ym. 2013: 575–576.)

## 2.2 Sädetys

Terveysvaikutusten osalta säteily jaetaan ionisoivaan ja ionisoimattomaan säteilyyn (Lehto – Stenbäck 2012: 23). Syöpäkasvaimien hoidossa käytetään erityisesti ionisoivaa säteilyä, jonka tarkalla valinnalla yritetään minimoida säteilyn aikaansaamat haitat terveeseen kudokseen. Ionisoivan säteilyn vaikutus on joko suoraa tai epäsuoraa. Suorassa vauriossa ionisoivan säteilyn vaikutus saa aikaan DNA:n kaksoisjuosteiden katkoksia tai sidosrakenteen muutoksia. Tämä johtuu siitä, että DNA tai proteiinit absorboivat energiaa joutuessaan säteilyn kohteeksi. Ionisoivan säteilyn epäsuoravaikutus tapahtuu veden radiolyttisen hajoamisen kautta. Tässä DNA:ta ja proteiineja vaurioitavat toksiset hydroksyyli-radikaalit ja muut reaktiokykyiset radikaalit, joita syntyy veden hajotessa. (Lehto – Stenbäck 2012: 25–26.)

Opinnäytetyössä käytetyt kudokset oli säteilytetty  $^{137}\text{Cs}$  radionuklidilla 10 grayn annoksella (af Hällström 2013). Yksiköllä gray (Gy) kuvataan ionisoivan säteilyn absorboitunutta annosta (säteilyenergiaa per massa). Yksi gray on verrattavissa yhden joulen määrään energiaa, joka on absorboitunut yhteen kilogrammaan kudosta. (Lehto – Stenbäck 2012: 24.) Sädetyksen aiheuttama DNA-vaurio saa aikaan DNA-vaurioproteiinien aktivoitumisen. Nämä proteiinit voivat vaikuttaa solusyklin pysäyttämiseen, aktivoida vaurioiden korjausmekanismit tai, jos vaurio on liian suuri, niin ne voivat käynnistää apoptoosin. (Wood – Chen: 2–3.)

## 3 Histologiset menetelmät

Näytteet oli fiksoitu, kuduskuljetettu, valettu ja leikattu valmiiksi opinnäytetyömme värjäyksiä varten. Fiksaatio estää kudoksen hajoamisen. Fiksaation jälkeen kuduskuljetuksessa ja valamisessa valmistetaan kudos mikrotomilla leikkausta varten.

### 3.1 Fiksaatio

Fiksaation tehtävänä on lopettaa solun aineenvaihdunta, estää solujen ja kudoksen entsyymaattinen hajoaminen eli autolyysi sekä tappaa patogeeneja kuten bakteerit, sienet ja virukset. (Ross – Pawlina: 2.)

Fiksaatio tunkee läpi kudoksesta ja kovettaa kudosta. Fiksatiivin läpätunkevuus on tärkeä ominaisuus, koska vain oikeanlaisella fiksaatiolla taataan se, että sekä kudoksen sisä- että ulkopuoli on fiksoitunut. Lämpötila jossa fiksaatio tapahtuu voi vaikuttaa kudoksen morfologiaan. Yleensä ottaen, mitä lämpimämmässä fiksaatio tapahtuu, sitä paremmin kudoksesta fiksoituu, mutta autolyysin mahdollisuus kasvaa. Nykyään fiksoidaan näytteitä kudokäsittelijöissä ja mikroaaltouuneissa jopa 45 °C:ssa, eikä sillä ole raportoitu olevan haittaa kudoksen morfologiseen tarkasteluun. (Carson – Hladik 2009: 2–4.)

Kudoksen paksuudella on suuri merkitys fiksaatiivin läpätunkeutumisen kannalta. Tilavuudeltaan fiksaatiivia itseään tulisi olla 15–20 kertaa enemmän kuin näytettä. Aika, joka kuluu ennen fiksaatiota, on tärkeä fiksaation kannalta. Ideaalitapauksissa näyte siirretäisiin fiksaatiiviin heti toimenpiteen jälkeen. Mitä enemmän aikaa kuluu verenkierron katkaisun ja fiksaation välillä, sitä enemmän mikroskooppisia muutoksia tapahtuu. Myös fiksaatioaika on tärkeä. Fiksaatioajan on oltava tarpeeksi pitkä jotta, fiksaatiivi ehtii tunkeutua kudoksen läpi, muttei liian pitkä, jotta kudoksesta ei kovettuisi liikaa. Liian pitkä fiksaatio aiheuttaa kudoksen kovettumista ja epitooppien peittymistä. (Carson – Hladik 2009: 4–6; Kumar – Rudbeck 2008: 51.)

Tässä työssä kudosiselityksen jälkeinen eturauhaskudosten fiksaatio tapahtui neutraalilla fosfaattipuskuroidulla 10-prosenttisella formaliinilla. Tämä liuos sisälsi 4 % formaldehydiä. Formaldehydi on liuotin joka veden kanssa muodostaa liuoksen, jossa formaldehydiä on 37–40 %. Tätä liuosta kutsutaan formaliiniksi. (Rhodes 2013: 73.) 10-prosenttinen formaliini on tärkein käytössä oleva fiksaatiivi. Formaliini tunkeutuu kudoksen läpi nopeasti mutta fiksoi hitaasti. Formaliini aiheuttaa myös vähemmän kutistumista kuin muut fiksaatiivit. (Carson – Hladik 2009: 9–11.) Opinnäytetyössä käytetyt kudokset oli fiksoitu yön yli formaliinissa.

## 3.2 Kudoskuljetus

Formaliinifiksaation jälkeen kudokset olivat valmiita kudoskuljetukseen laitettaviksi. Optimoimme immunohistokemiallisia värjäyksiä kahdelle eri kudoskuljettimelle. Toinen oli HUSLAB:n perinteinen kudoskuljetin ja toinen FIMMlab:n mikroaaltokudoskuljetin. Kuviossa 2 on esitetty molempien kudoskuljettimien kudosprosessointivaiheet. Kudoskuljetuksessa on tarkoitus poistaa kudoksesta vesi ja imeyttää nestemäinen parafiini tilalle (Spencer – Bancroft 2013: 105). Kudoskuljetus kovettaa kudusrakenteet, koska se kiinnittää kudokset poistamalla niistä veden ja rasvan. Lisäksi kudoskuljetus tekee kudoksista myös säilyviä. Lopussa lisättävä parafiini kovettuu kudosten sisään. Parafiinin ansiosta kudoksesta voidaan leikata 2-5 µm:n paksuisia leikkeitä lasille. (Mäkinen 2012: 1128.)

### 3.2.1 Perinteinen kudoskuljetus

Dehydraatiossa vesi poistetaan kudoksesta yleensä etanolilla. Yleensä käytössä on nousevaa etanolisarja, joka päättyy 100-prosenttiseen etanoliin. (Mescher 2013: 2–3.) Dehydraatio tulisi suorittaa hitaasti, sillä jos kudoksen sisäisen ja ulkoisen nesteiden välinen konsentraatiogradientti on liian suuri, tapahtuu diffuusiota edestakaisin solukalvoilla nesteenvaihdon aikana. Tämä lisää solujen muodon muutoksen mahdollisuutta. Tästä syystä kudokset käsitellään dehydraatiossa reagenssien (etanolin) nousevalla konsentraatiosarjalla. Liiallinen dehydraatio saattaa tehdä kudoksesta kovan, hauraan ja kutistuneen. Epätäydellinen dehydraatio taas estää kirkastusreagenssien imeytymisen kudokseen. (Spencer – Bancroft 2013: 107–108.)

Dehydraation jälkeen etanoli korvataan orgaanisella liuottimella. Liuottimen pitää liueta sekä alkoholiin että parafiiniin. Kudoksesta tulee läpikuultava, kun liuotin imeytyy siihen. Tätä vaihetta kutsutaan kirkastukseksi. (Mescher 2013: 2–3.) Kirkastukseen käytettävää ainetta valittaessa otetaan huomioon kirkastusaineen nopeus dehydroivan aineen poistossa. Kirkastusaineen tulee olla helposti poistettavissa sulalla parafiinilla ja oikealla kirkastusaineella minimoidaan kudoksen tuhoutuminen. Lisäksi huomioidaan kirkastusaineen syttyvyys, myrkyllisyys sekä hinta. Ksyleeni on yksi mahdollisista kirkastukseen käytettävistä aineista. Se on helposti syttyvä, väritön ja sekoittuu hyvin suuriin osiin orgaanisista liuottimista ja parafiiniin. Liian pitkä altistuminen ksyleenille saa aikaan kudoksen liiallisen kovettumisen. Ksyleeniä käytetään usein histologisissa laboratorioissa ja se on kierrätettävissä. (Spencer – Bancroft 2013: 108–109.)

Kirkastuksen jälkeen vuorossa on tukiaineen imeytys. Kudokseen imeytetään sulaa parafiinia, jonka lämpötila on 52–60 °C. Näin korkeassa lämpötilassa, kirkastusliotin haihtuu ja parafiini täyttää kudoksen. Huoneenlämmössä parafiinilla kyllästetty kudos kovettuu. (Mescher 2013: 2–3.) Parafiini estää kudoksen muodonmuutoksen mikrotomilla leikattaessa (Spencer – Bancroft 2013: 109).

### 3.2.2 Mikroaaltokudoskuljetus

FIMMlabissa kuduskuljettimena oli Milestonen mikroaaltokudoskuljetin (KOS -Rapid Microwave Labstation). Ennen kuduskuljettimien laittoa näytekasetit huuhdeltiin kaksi kertaa viisi minuuttia 100-prosenttisessä etanolissa ylimääräisen veden ja formaliinin poistamiseksi (KOS Rapid Microwave Labstation 2012: 44–45). Mikroaaltoprosessoinnissa käytetään kolmea reagenssia: etanolia, isopropanolia ja parafiinia (Spencer – Bancroft 2013: 111). Mikroaaltoprosessointi lyhentää huomattavasti kudoksen käsitteilyaikoja ilman että laatu tai tulkinta kärsii (Babu – Malathi – Magesh 2011: 50–55). Mikroaallot parantavat liuosten diffuusiota kudokseen lisäämällä kudoksen sisäistä lämpöä, jolloin reaktioajat lyhenevät. Asteittainen etanolikonsentraatiosarja on tarpeeton mikroaaltoprosessoinnissa. Myöskään kirkastusreagenssia ei välttämättä tarvita, koska viimeisen parafiinivaiheen lämpötila auttaa alkoholin haihtumista. Lisäksi ksyleeniä ja formaliinia ei käytetä, mikä lisää työturvallisuutta, kun ei synny myrkyllistä höyryä tai käsitellä karsinogeeniä. Oikein suoritettuna mikroaaltoprosessointi antaa hyvän tuloksen tinkimättä kudoksen morfologiasta ja antigeenisyydestä. (Spencer – Bancroft 2013: 110–111.)

HUSLAB kuduskuljetus			FIMMlab kuduskuljetus		
Kuduskuljetus:			Huoneenlämmössä:		
<u>Reagenssi</u>	<u>Lämpötila</u>	<u>Aika</u>	<u>Reagenssi</u>	<u>Lämpötila</u>	<u>Aika</u>
Formaliini	37 <sup>0</sup> C	1 t	Etanoli 100%	huoneen- lämpö	5 min.
Formaliini	37 <sup>0</sup> C	1 t	Etanoli 100%	huoneen- lämpö	5 min.
Etanoli 50 %	37 <sup>0</sup> C	0,5 t	<hr/>		
Etanoli 96 %	37 <sup>0</sup> C	0,5 t	Yhteensä 10 min.		
Etanoli 96 %	37 <sup>0</sup> C	0,5 t	Kuduskuljettimessa:		
Etanoli 100 %	37 <sup>0</sup> C	0,5 t	<u>Reagenssi</u>		<u>Aika</u>
Etanoli 100 %	37 <sup>0</sup> C	1 t	Etanoli 100%		20 min.
Etanoli 100 %	37 <sup>0</sup> C	2 t	Isopropanoli		30 min.
Ksyleeni	37 <sup>0</sup> C	1 t	Parafiini		55 min.
Ksyleeni	37 <sup>0</sup> C	1,5 t	<hr/>		
Parafiini	60 <sup>0</sup> C	1,5 t	Yhteensä 1t 45 min		
Parafiini	60 <sup>0</sup> C	1,5 t	Kokonaisaika 1t 55 min.		
Parafiini	60 <sup>0</sup> C	1,5 t			
Kokonaisaika 14 t					

Kuvio 2. HUSLAB:n ja FIMMlab:n kuduskuljetusprosessit (mukaillen Kuduskuljetus 2013; KOS Rapid Microwave Labstation 2012: 44–45).

### 3.3 Valaminen ja leikkaaminen

Valuvaiheessa näyte asetetaan muottiin oikein päin ja painetaan pohjaan oikeassa orientaatioissa. Näyte kiinnitetään pienellä määrällä parafiinia, minkä jälkeen näytteen päälle asetetaan kasetti ja muotti täytetään parafiinilla. Parafiini jäähdytetään kylmälämpötilällä jolloin se jähmettyy, jonka jälkeen muotti voidaan irrottaa. (Spencer – Bancroft 2013 110; af Hällström 2013.) Parafiinivalun jälkeen näytteet tulisi jäähdyttää mahdollisimman nopeasti (Carson – Hladik 2009: 43). Muodostunut parafiiniblokki voidaan leikata mikrotomilla (Mescher 2013: 3). Mikrotomin veitsen on oltava tarpeeksi terävä, jotta saataisiin hyviä leikkeitä aikaiseksi. Rutiininäytteiden osalta leikkeen paksuus ei

saisi ylittää yhtä solukerrosta. Yleensä näytteet leikataan noin 4–5 µm:n paksuisiksi leikkeiksi. (Carson – Hladik 2009 58.)

## 4 Immunohistokemialliset menetelmät

Immunohistokemiallisilla menetelmillä pyritään osoittamaan tietyn antigeenin olemassa olo tai puuttuminen näytteestä ja tätä varten on kehitetty useita menetelmiä. Yksinkertaisin on suora immunohistokemiallinen menetelmä. (Mäkinen – Stenbäck 2012: 1135.) Suorat immunohistokemialliset menetelmät ovat epäsuoria menetelmiä nopeampia (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 97). Tässä työssä käytämme kuitenkin epäsuoria menetelmiä, koska niiden herkkyys on parempi. Menetelmän valintaan vaikuttaa usea tekijä esimerkiksi antigeenin esiintymispaikka solussa sekä fiksatiivi ja sen fiksaatioaika (Mäkinen – Stenbäck 2012: 1135). Lisäksi kudospeljetus vaikuttaa merkittävästi menetelmän valintaan (af Hällström 2013).

### 4.1 Antigeeni ja vasta-aineet

Antigeeni on molekyyli, joka saa aikaan immuunireaktion ja vasta-ainetuotannon. Kudoksessa antigeeneinä voivat olla esimerkiksi proteiinit, nukleiinihapot, hiilihydraatit ja rasvat. Antigeenin osat eli epitoopit ovat vasta-aineen tunnistus- ja sitoutumiskohtia. Vasta-aine sitoutuu antigeeniin spesifisesti. Vasta-aine on proteiinimolekyyli, jota immuunijärjestelmän B-imusolut tuottavat. Se on rakenteeltaan immunoglobuliini, joka on muodostunut spesifisesti tiettyä antigeeniä vastaan. (Tirri – Lehtonen – Lemmetyinen – Pihakaski – Portin 2006: 55, 756.) Vasta-aineet luokitellaan mono- tai polyklonaalisiin vasta-aineisiin (Mäkinen – Stenbäck 2012: 1135). Työssämme käytimme monoklonaalista vasta-ainetta primaarivasta-aineena ja polyklonaalista vasta-ainetta sekundaarivasta-aineena.

Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan yleensä immunisoimalla hiiriä tiettyä antigeeniä vastaan. (Rittenhouse-Olson – De Nardin: 2013: 37) Kun eläin on saatu immunisoitua, sen pernasta eristetään lymfosyyttejä, jotka yhdistetään viljeltyihin myeloomasoluihin. Näistä soluista jalostetaan hybridisoluviljelmä. (Mäkinen – Stenbäck 2012: 1135.) Tämä soluviljelmä jakaantuu loputtomasti ja tuottaa monoklonaalista vasta-ainetta (Kindt – Goldsby – Osborne 2007: 106). Hybridisoluviljelmästä siirretään yksittäisiä

soluja (klooneja) omiin jatkoviljelmiin. Jokainen klooni tunnistaa antigeenistä ainoastaan yhtä spesifistä epitooppia. Näitä vasta-aineita kutsutaan siksi monoklonaalisiksi vasta-aineiksi. (Delves – Martin – Burton – Roitt 2012: 143; Murphy 2012: 732; af Hällström 2013.)

Polyklonaalisia vasta-aineita tuotetaan pienissä eläimissä, yleensä kanissa (Delves ym. 2012: 142). Polyklonaalisten vasta-aineiden tuottoa varten eläin immunisoidaan spesifillä immunogeenilla, joka sisältää halutun antigeenin (Jackson – Blythe 2013: 384). Immunisaation kautta syntyneet vasta-aineet kerätään eläimen seerumista (Delves ym. 2012: 142). Polyklonaalisten vasta-aineiden käytön ongelmana on ristireaktio näytteen muiden proteiinien kanssa. Polyklonaalinen vasta-aine tunnistaa antigeenista useita eri epitooppeja, jotka saattavat olla homologisia muiden proteiinien kanssa. (Mäkinen – Stenbäck 2012: 1135.)

#### 4.2 Suora ja epäsuora immunohistokemiallinen menetelmä

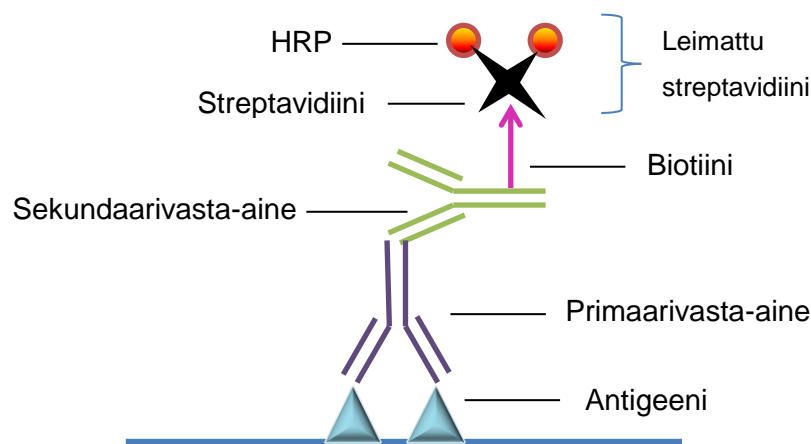
Suorassa immunohistokemiallisessa menetelmässä antigeeniin sitoutuu vasta-aine, johon on liitetty esimerkiksi entsyymi. Epäsuorassa immunohistokemiallisessa menetelmässä antigeeniin sitoutuu ensin vasta-aine, jota kutsutaan primaarivasta-aineeksi. Tämän jälkeen primaarivasta-aineeseen liitetään toinen vasta-aine (sekundaarivasta-aine). Sekundaarivasta-aineessa on kiinni entsyymi. (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 97–98.) Entsyymireaktio voidaan saada näkyviin väriaineen eli kromogeenin avulla (Mäkinen – Stenbäck 2012: 1136). Immunoentsyymimenetelmiä on useita mutta opinäytetyössä keskitytään värjäysmenetelmistä epäsuoraan kromogeeniseen (stept)avidini-biotiini- menetelmään ja polymeeritekniikkaan.

#### 4.3 (Strept)avidini-biotiini -menetelmä

Avidiinin voimakasta sitoutumiskykyä biotiiniin käytetään hyväksi immunohistokemiallisissa värjäyksissä (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 98). Avidiini on munanvalkuaisen proteiini (Tirri ym. 2006: 71). Se on positiivisesti varautunut neutraalissa pH:ssa, koska se on glykoproteiini ja sen isoelektrinen piste on suunnilleen 10. Tästä johtuen avidiinillä on taipumus sitoutua epäspesifisesti lektiininkaltaisiin ja negatiivisesti varautuneisiin kudosten rakenneosiin, kuten solun tumaan, fysiologisessa pH:ssa. Tämän takia avidiini aiheuttaa epäspesifistä taustavärjäytymistä. (Key 2009: 58; Jackson – Blythe. 2013:

389.) Avidiinin tilalla voidaan käyttää streptavidiniä (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 99). Streptavidini on proteiini, joka on eristetty *Streptomyces avidinii*-bakteerista. Silläkin on voimakas taipumus liittyä biotiiniin kuten avidiinilla (Tirri ym. 2006: 71, 674). Streptavidiinilta puuttuu hiilihyaattiosat ja sen isoelektrinen piste on neutraali. Tämän vuoksi streptavidini tuottaa vähemmän epäspesifistä taustaa kuin avidiini. (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 99.) Isoelektrinen piste on pH-arvo, jossa esimerkiksi proteiinien positiivisten ja negatiivisten varausten summa on pienimmillään tai nolla. (Tirri ym. 2006: 282). Avidiinilla ja streptavidiinilla on neljä sitoutumiskohtaa biotiinille (Key 2009: 57). Käytännössä kuitenkin kiinnittymiskohtien molekyylien järjestäytymisen vuoksi, vähemmän kuin neljä biotiinia kiinnittyy (Jackson – Blythe. 2013: 389). Biotiini on helppo konjugoida vasta-aineisiin ja entsyymeihin (Key 2008: 57).

(Strept)avidini-biotiini -menetelmä on kolmivaiheinen immunohistokemiallinen epäsuoramenetelmä (Kuvio 3). Ensimmäisessä vaiheessa vasta-aine (primaarivasta-aine) sitoutuu antigeeniin. Opinnäytetyössämme primaarivasta-aineena käytettiin  $\gamma$ H2AX:ää tai pilkottu kaspasi-3:a. Toisessa vaiheessa primaarivasta-aineeseen sitoutuu biotinyloitu sekundaarivasta-aine. Kolmantena kerroksena voidaan käyttää entsyymileimattua (strept)avidiniä tai entsyymileimatun biotiinin ja (strept)avidinin kompleksia. (Jackson – Blythe 2013: 389). Entsyymileimattu streptavidini ei vaadi reagenssien sekoittamista etukäteen (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 99). Jos käytetään avidiini-biotiini kompleksia, reagenssit täytyy sekoittaa 30 minuuttia ennen käyttöä (Jackson – Blythe 2013: 389). Opinnäytetyössä käytimme värjäyksessä entsyymileimattua streptavidiniä. Entsyyminä on piparjuuriperoksidaasi (HRP). HRP:n substraattina toimii peroksidi. Värireaktio syntyy kromogeenin (väriaineen) avulla. Yleisesti käytössä on 3,3'-diaminobentsidiinitetra-hydrokloridi, eli DAB. (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 101.)

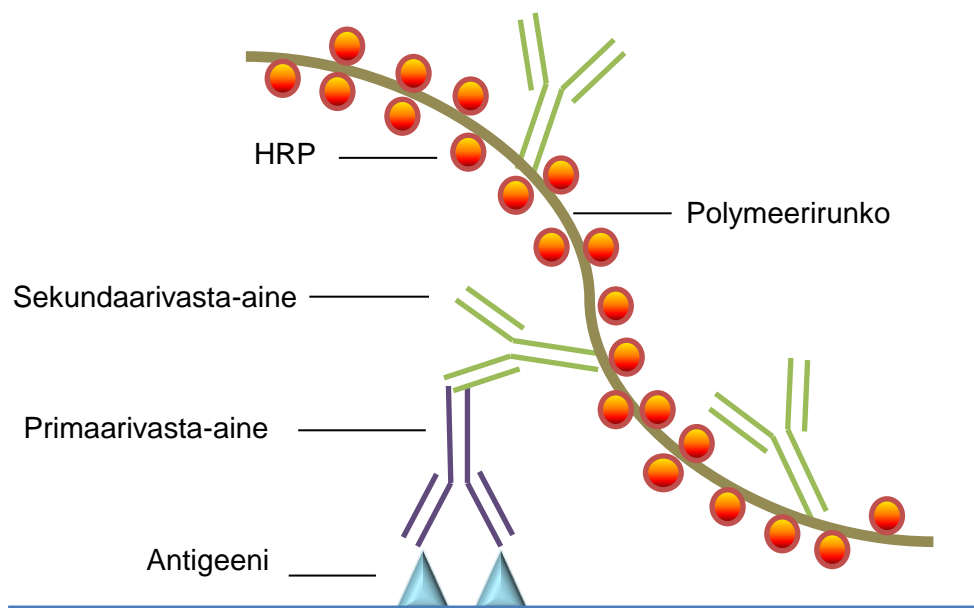


Kuvio 3. Streptavidini-biotiini-menetelmä (mukaillen Renshaw 2007: 87).



#### 4.4 Polymeeritekniikka

Polymeeritekniikassa primaarivasta-aineeseen sitoutuu sekundaarivasta-aine, johon on kiinnitetty polymeeriketju. Polymeeriketju on yleensä leimattu piparjuuriperoksidiasientsyymillä (HRP) (kuvio 4). (Jackson – Blythe 2013: 388.) Entsyymin substraattina käytetään vetyperoksidia. Haluttu väri saadaan kromogeeneillä (esimerkiksi DAB). Entsyymi reagoi substraattinsa ja väriaineen kanssa, jolloin muodostuu ruskea sakka. Värillinen saostuma näkyy valomikroskoopissa vasta-aineiden sitoutumispaikoissa. (Rantala – Laasonen 2000: 149.) Polymeeriketjussa voi olla kiinni jopa 70 entsyymimolekyyliä ja 10 sekundaarivasta-ainetta (Jackson – Blythe 2013: 388). Koska pitkissä polymeeriketjuissa on paljon sitoutumiskohtia väriainemolekyyleille, värjäytyminen on voimakkaampi verrattuna muihin immunoentsyymimenetelmiin (Mäkinen – Stenbäck 2012: 1136).



Kuvio 4. Polymeeritekniikka havainnollistettuna kuvan avulla (mukaiillen Key 2009: 59).

#### 4.5 Piparjuuriperoksidaasi

Piparjuuriperoksidaasi (HRP) on eniten käytetty entsyymi immunohistokemiallisissa värjäyksissä. Se on suhteellisen pieni proteiini, joka käyttää peroksidia substraattina. (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 101.) Piparjuuriperoksidaasia käytetään useamman syyn takia. Pienen kokonsa ansiosta siitä ei ole haittaa vasta-aineiden sitoutumiselle

vierekkäin. Sitä on helposti saatavilla puhtaassa muodossa, joten sen kontaminoituminen on minimoitu. Lisäksi se on stabiili entsyymi, joka pysyy muuttumattomana säilytyksessä ja käytössä. Sen kanssa käytettäviä kromogeeneja on saatavilla useita. (Jackson – Blythe 2013: 384–386.)

#### 4.6 DAB ja hematoksyliini

DAB-kromogeeni on suosittu signaalinantaja peroksidaasipohjaisiin immunohistokemiallisiin värjäyksiin (Boenisch 2008: 17; Pace 2008: 114). Käyttämämme DAB-kitti sisälsi DAB-substraattipuskurin ja DAB-kromogeenin, jotka yhdistettiin juuri ennen värjäystä (DAB-manuaalivärjäys 2009; DAB-automaattivärjäys). DAB:lla saadaan aikaan ruskea väri, joka ei liukene orgaanisiin liuottimiin. Sen kontrasti hematoksyliini vastaväriin kanssa on hyvä (Kenny-Moynihan – Unger 2003: 101). Vastaväri antaa lisäinformaatiota ja auttaa rakenteiden tunnistamisessa, koska monissa immunohistokemiallisissa värjäyksissä vain tietyt kudoksen osat värjäytyvät. Vastaväri on yleensä yksittäinen väri, joka lisätään erikseen näytteeseen. (Mescher 2013: 5.) Opinnäytetyössämme käytimme vastaväriä hematoksyliiniä, joka värjää happamat rakenteet tumman violeteiksi (Young – Stewart – O’Dowd 2011: 316). Hematoksyliinivärjäys on luotettava, edullinen ja informatiivinen. (Stevens – Lowe 2005: 6).

#### 4.7 Antigeenin paljastus

Formaliinifiksaatio säilyttää kudoksen morfologian mutta se myös muuttaa kudosten proteiinien kolmiulotteista rakennetta. Tämä voi peittää antigeenien epitooppeja ja/tai muuttaa sähkövarauksia. (Kumar – Rudbeck 2008: 51.) Kun käytetään formaliinifiksaatiota, molekyylien sisäisiä ja ulkoisia ristsidoksia muodostuu tiettyjen rakenneproteiinien kanssa. Tämä johtaa antigeenien peittymiseen. (Jackson – Blythe 2013: 390.) Epitoopin menetyksen jälkeen vasta-aine ei pysty tunnistamaan antigeeniä. Tämä voidaan korjata antigeenin paljastuksella. Antigeenien negatiivisten sähkövarausten väheneminen pienentää antigeenin ja vasta-aineen välistä sitoutumiskykyä. Tämä voidaan estää pidentämällä primäärivasta-aineen inkubaatioaikoja tai käyttämällä erilaisia vastaaineliuoksia. Antigeenin paljastukseen voidaan käyttää erilaisia entsyymi- ja lämpömenetelmiä. (Kumar – Rudbeck 2008: 51.)

Antigeenin paljastukseen on olemassa useita menetelmiä kuten mikroaaltouuni, painekattila, entsyymimenetelmä ja lämpöön perustuva menetelmä (Jackson – Blythe 2013: 390). Opinnäytetyössä käytimme PT-moduulia, joka on HIER-menetelmä (heat induced epitope retrieval). HIER-menetelmässä antigeenin paljastus perustuu lämpöön. Aikaisemmin FIMM:ssä on käytetty mikroaaltouunia, mutta sittemmin on siirrytty PT-moduuliin. Se on stabiilimpi ja hellävaraisempi kuin mikroaaltouuni. (af Hällström 2013.) PT-moduuli on automaattinen kuumennuslaite. Sen käyttö perustuu kolmeen vaiheeseen: alkulämmityksen, inkubaatiovaiheeseen ja jäädytysvaiheen. (Kumar – Rudbeck 2008: 52.) Lämpötila on inkubaatioissa asetettu alle kiehumispisteen, siksi se on hellävarainen kudoksille. Puskuri ei myöskään haihdu ja sitä voidaan käyttää uudelleen. (Jackson – Blythe 2013: 394.) Antigeenin paljastukseen on olemassa erilaisia puskureita, jotka eroavat koostumukseltaan ja pH-arvolta. Puskurit vaikuttavat antigeeni-vastaaine sitoutumiseen eri tavalla. Näitä puskureita ovat sitraatti pH 6.0, TRIS/EDTA pH 9.0 ja TRIS pH 6.0. (Wendelboe – Bisgaard 2008: 117.) Opinnäytetyössämme käytimme PT-moduulissa sitraattipuskuria, jonka pH oli 6.0.

#### 4.8 Taustavärjäytyminen

Taustavärjäytymisen yleisimmät syyt immunohistokemiassa ovat endogeeninen entsyymiaktiivisuus sekä hydrofobiset- ja ionireaktiot (Jackson – Blythe 2013: 402–403). Useimissa immunohistokemiallisissa värjäyksissä käytetään kahta blokkausreaktiota. Ensimmäinen käytetty blokkausmenetelmä on vetyperoksidin käyttö. (Carson – Hladik 2009: 287.) Kudoksessa on samankaltaisia entsyymejä, joita on vasta-aineleimoissa (endogeeninen peroksidaasiaktiivisuus) (Jackson – Blythe 2013: 402–403). Tämä endogeeninen peroksidaasiaktiivisuus voi tuottaa vääriä positiivisia signaaleja, jotka haittaavat immunohistokemiallista värjäystä (Pace 2008: 110). Yleisimmin käytössä oleva menetelmä endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden poistamiseksi formaliinifiksoiduissa kudoksissa on kudoksenleikkien inkubointi kolmi-prosenttisessä vetyperoksidissa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) viidestä kymmeneen minuuttiin (Wendelboe – Bisgaard 2008: 115).

Toista blokkausta käytetään vähentämään epäspesifistä vasta-aineen sitoutumista. Immunohistokemiallisissa menetelmissä käytettävät vasta-aineet ja detektiomenetelmät ovat proteiinipohjaisia ja ovat siksi herkkiä saamaan aikaan epäspesifiä taustavärjäytymistä. (Pace 2008: 111.) Proteiiniblokkauksella estetään epäspesifinen taustavärjäytyminen, joka voi ilmaantua vasta-aineen tarttumisesta varautuneisiin kollageeni- ja sidekudossäikeisiin (Carson – Hladik 2009: 287). Näytekudoksen proteiinin sitoutumis-

kohdat peitetään proteiiniblokilla ennen primaarivasta-aineen lisäystä. Tällä tavoin voi huomattavasti vähentää epäspesifisen taustan muodostumista. (Pace 2008: 111.) Proteiiniblokkina voidaan käyttää maitojauhetta (Carson – Hladik 2009: 287).

Lisäksi normaaliseerumia voidaan käyttää taustavärjäytymisen estämiseen. Perinteisesti ei-immuuniseerumi (normaaliseerumi) on samasta eläinlajista, jossa sekundaarivasta-aine (polyklonaalinen vasta-aine) on kasvatettu. Käytännössä minkä tahansa eläimen seerumia tai proteiinia voidaan käyttää immunohistokemiallisissa värjäyksissä, niin kauan kunhan sitä ei voida tunnistaa värjäyksessä käytettävillä vasta-aineilla, eli se ei ristireagoi värjäyksessä. (Jackson – Blythe 2013: 403.) Epäspesifi vasta-aineen sitoutuminen voi olla ongelma polyklonaalisten vasta-aineiden käytön kanssa. Normaaliseerumilla (NGS) voi varata ei toivotut sitoutumispaikat. (Taylor – Shi – Barr – Wu 2006: 4)

Normaaliseerumi lisätään juuri ennen primaarivasta-ainetta (Carson – Hladik 2009: 287). Opinnäytetyössämme käytimme maitoblokkia, joka sisälsi rasvatonta maitojauhetta, normaalia vuohen seerumia ja Triton X-100:a. Triton X-100 on detergentti, joka vähentää pintajännitystä. Sen ansiosta aineiden imeytyminen paranee (Tirri ym. 2006: 726). Triton X-100 vähentää epäspesifistä värjäytymistä, koska se estää heikkojen sidosten syntymistä vasta-aineen ja kudoksen välille (Hartman 1973: 315; Jackson – Blythe 2013: 403).

## 5 $\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspasi-3

$\gamma$ H2AX mittaa DNA-vauriota sekä solukuolemaa ja värjää solun tumat. Pilkottu kaspasi-3 taas mittaa yksinomaan solukuolemaa ja värjää solun sytoplasman. Opinnäytetyössämme käytössä oli Milliporen  $\gamma$ H2AX -vasta-aine ja Cell Signalingin pilkottu kaspasi-3 vasta-aine.

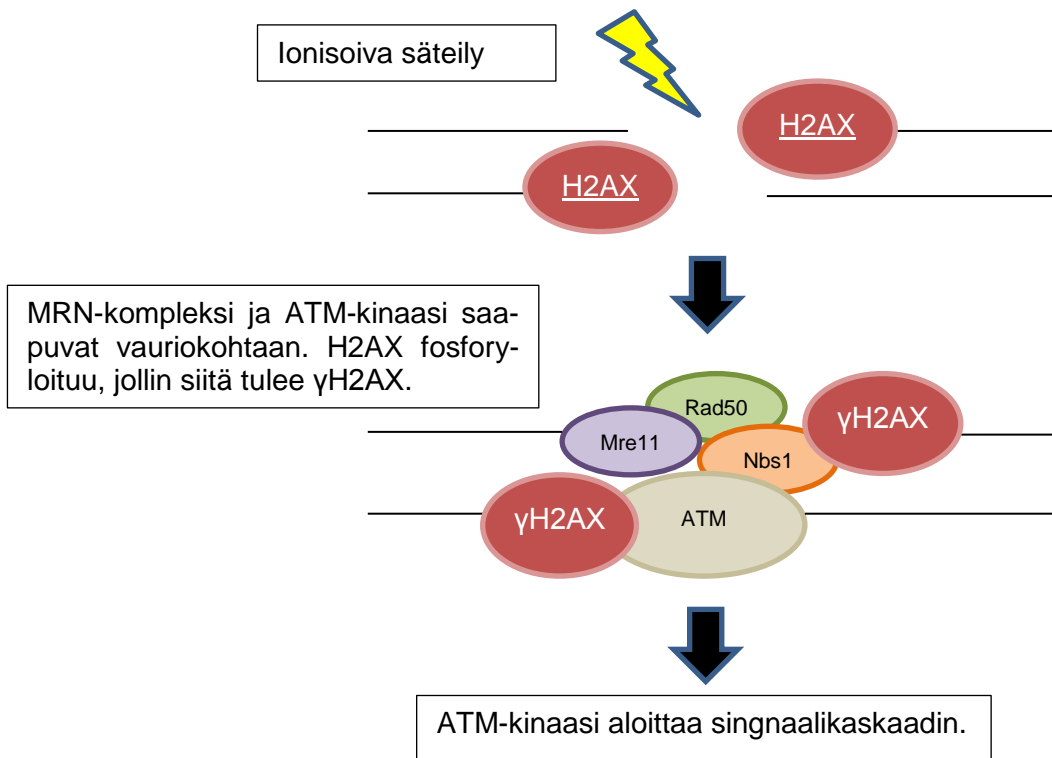
### 5.1 $\gamma$ H2AX

DNA on normaalisti kietoutunut tumassa histonimolekyylien ympärille. Hisoni on muodostunut neljästä yksittäisestä histoniproteiinista H2A, H2B, H3 ja H4, joita kutakin on kaksi kappaletta. (Brown 2012: 215.) H2AX on osa H2A proteiiniperhettä. H2A protei-

iiniperheellä on useita variantteja kuten H2A1, H2AX ja H2AZ. (Ausió – Abbott 2002: 5946–5948.)

DNA:n kaksoisjuosteen katkos on vaikea DNA-vaurio, koska DNA hajoaa kahdeksi osaksi. Tällöin osat pitää tuoda yhteen, jotta vaurio saadaan korjattua. Korjauksessa pitää varmistaa, että oikeat DNA:n päät saadaan yhteen. DNA:n kaksoisjuosteen katkoksia saa aikaan ionisoiva säteily ja jotkut kemialliset mutageenit (Brown 2012: 328–329.) Ionisoivan säteilyn jälkeen H2AX fosforyloituu nopeasti. Fosforyloitua H2AX:ää kutsutaan  $\gamma$ H2AX:si. Suurin osa  $\gamma$ H2AX:stä fosforyloituu 1–3 minuutissa ionisoivan säteilyn jälkeen. (Rogakou – Pilch – Orr – Ivanova – Bonner 1998: 5858; Rogakou – Boon – Redon – Bonner 1999: 905.) Myös monet lääkkeet, erityisesti sellaiset jotka aiheuttavat DNA:n kaksoisjuosteen katkoksen, johtavat  $\gamma$ H2AX:n fosforyloitumiseen (Huang ym. 2004: 99).

MRN-kompleksi (Mre11-Rad50-Nbs1) toimii DNA:n kaksoisjuosteen katkoksen tunnistajana. Tämän jälkeen ATM-kinaasi (ataxia-telangiectasia mutated) saapuu katkoksen luokse (kuvio 5). DNA:n kaksoisjuosteen katketessa ATM-kinaasi fosforyloi proteiineja (esimerkiksi p53 ja H2AX), jotka aloittavat solusyklin pysäyttämisen, apoptoosin ja DNA:n korjauksen. (Lee – Paull 2005: 551.) H2AX on avaintekijä DNA-vaurion korjausprosessissa. (Kobayashi 2004: 474). p53 taas säätelee solunjakautumista ja solukuolemaa (Brown 2012: 229).



Kuvio 5. DNA:n kaksoisjuosteen katkoksen jälkeen ATM aloittaa signaalikaskaadin, joka voi laukaista solusyklin pysäyttämisen, DNA:n korjauksen tai apoptoosin (mukaillen Wood – Chen 2006: 3).

## 5.2 Pilkottu kaspasi-3

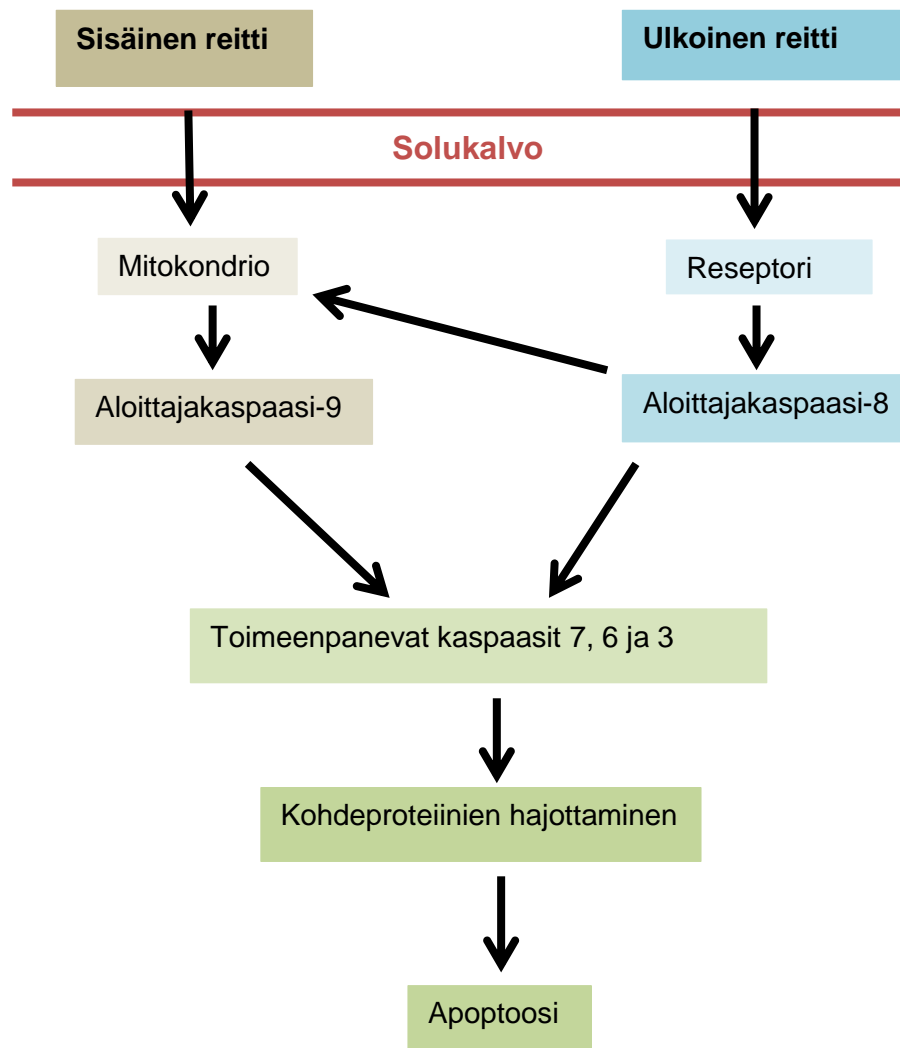
Apoptoosi eli solun ohjelmoitu itsetuhomekanismi on keskeinen ja monimutkainen biologinen prosessi, joka mahdollistaa organismin solujen hävittämisen (Rubin – Strayer 2008: 26). Täysikasvuiset elimet ylläpitävät kokoaan tasapainottamalla solumassan lisääntymistä apoptoosilla (Voet – Voet – Pratt 2008: 1087). Solukuolema tapahtuu joko apoptoottisesti tai nekroottisesti. Apoptoottisessa solukuolemassa solu kutistuu ja tiivistyy. Solun tukiranka romahtaa, tuma hajoaa ja tuman genomi fragmentoituu. (Alberts ym. 2008: 1115.) Solumembraaniin tulee reikiä ja se hajoaa kappaleiksi. Lopulta solun kappaleet fagosytoidaan. (Kierszenbaum – Tres 2012: 102.)

Apoptoosin läpikäyvät solut tunnistaa yleensä morfologisesti mutta myös biokemiallisin menetelmin (Alberts ym. 2008: 1117). Apoptoottiset solut ovat tunnistettavissa tuman fragmentaatiosta ja pyknoottisuudesta. Solun sisäiset mekanismit apoptoosin takana ovat samat kaikissa eläinsoluissa. Apoptoosi on riippuvainen kaspaseista. (Alberts ym. 2008: 1118.) Kaspasit (kysteiniistä riippuvaiset aspartaattispesifiset proteaasit)

syntetisoidaan solussa inaktiivisena prekursoreina, jotka tyypillisesti aktivoituvat proteolyttisen pilkkoutumisen myötä (Tirri ym. 2006: 313; Alberts ym. 2008: 1118).

Useat tekijät voivat laukaista apoptoosin solussa kuten virusinfektiot tai esimerkiksi säteilyn aiheuttama DNA-vaurio. Apoptoottinen solun hajoaminen seuraa apoptoosin laukaisevien entsyymien aktivaatiota. Vaikka apoptoosin toimeenpanijat ovat hyvin erilaisia ne aiheuttavat apoptoosin käytännössä kahdella eri tavalla. Apoptoosi tapahtuu joko ulkoista reittiä, solun pinnan reseptorien kautta tai sisäistä reittiä, mitokondrioiden kautta. Kaspasit aktivoituvat molempien reittien kautta. Kaspaseista esimerkkejä ovat aloittajakaspasit 8 ja 9 sekä toimeenpanevat kaspasit 7, 6 ja 3. Nimensä mukaan aloittajakaspasit aktivoivat toimeenpanevia kaspaseja. Toimeenpanevat kaspasit taas hajottavat kohdeproteiineja solun sisällä joka johtaa apoptoosin solumorfologiaan. (Kujala 2012: 139–140.) Kuviossa 6 on esitetty apoptoosin ulkoinen ja sisäinen reitti.

Kaikki kaspasit pilkotaan, jotta ne aktivoituvat. Jokainen kaspasiperheen proteaasi aktivoituu, kun edeltäjänsä pilkotaan isompaan ja pienempään osaan (Hirata ym. 1998: 587; Tomita 2010: 24). Työssä käytetty polyklonaalinen pilkottu kaspasi-3 -vasta-aine tunnistaa spesifisesti kaspasi-3:n pilkotun muodon isoa yksikköä. Se ei tunnista pilkkomatonta kaspasi-3:a tai muita kaspasiproteaaseja. (Cleaved Caspase-3 2011.)



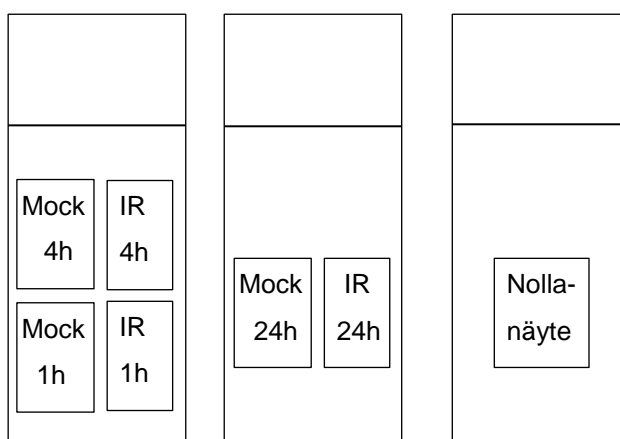
Kuvio 6. Apoptosimekanismit (mukaillen Kujala 2012: 139)

## 6 Näytteet

$\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspaasi-3 -vasta-ainevärjäyksissä käytettiin samoja potilasnäytteitä. Molemmista vasta-aineista tehtiin värjäyksiä sekä HUSLAB:ssa että FIMMLab:ssa kuduskuljetetuista näytteistä. Molemmissa laboratorioissa kuduskuljetetuista näytteistä oli valmistettu kudisleikkeet laselle seuraavasti (Kuvio 7): yhden tunnin jälkeen sädetyksestä kudosviljelystä poistettu näyte (IR 1h) ja sen kontrollinäyte (Mock 1h), neljän tunnin jälkeen sädetyksestä kudosviljelystä poistettu näyte (IR 4h) ja sen kontrollinäyte (Mock 4h), 24 tunnin jälkeen sädetyksestä kudosviljelystä poistettu näyte (IR 24h) ja



sen kontrollinäyte (Mock 24h) sekä lisäksi nollanäyte. Aikapisteen oli valittu aikaisemman tutkimusten perusteella. Aikaisemmassa tutkimuksessa  $\gamma$ H2AX signaali oli vahvimmillaan 1–4 tunnin kohdalla hyvänlaatuisessa (benignissä) eturauhaskudoksessa.  $\gamma$ H2AX:n väri-intensiteetti väheni 24 tunnin kohdalla hyvänlaatuisessa (benignissä) näytteessä DNA:n korjauksesta johtuen. (Jäämaa ym. 2010: 8633–8634, 8637.) Kudosleikkeitä oli tehty kahdesta eri potilaasta, joille oli annettu biopankin omat numerot. Muutimme nämä numerot kuitenkin muotoon HUB.A ja HUB.B tietosuojan takia. HUB.A-näytteestä ei ollut näytettä IR 24h aikapisteen kohdalla.



Kuvio 7. Kudosleikkeiden paikat lasilla.

## 6.1 Kontrollit

Kontrollien käyttämisellä immunohistokemiallisissa värjäyksissä tarkistetaan värjäysten onnistuminen. On tärkeää, että immunohistokemialliset värjäykset sisältävät kontroleita, jotta voidaan testata käytettävien vasta-aineiden spesifisyys. (Jackson – Blythe 2013: 404.) Ilman primaarivasta-ainetta ei immunohistokemiallisessa värjäyksessä tule saada positiivista värjäytymistä. Värjäysreagenssit, eivätkä primaarivasta-aineet saa tehdä taustaa. Käytettävässä kudoksessa voi olla esimerkiksi peroksidaasientsyymiä tai muuta endogeenista positiivisuutta, joka voi tuottaa virheellisen positiivisen lopputuloksen.

Negatiivisella kontrollilla tarkastetaan ovatko endogeeniset molekyylit pystytyt estämään (blokkamaan) tai tuhoamaan ennen värjäystä. Negatiivisessa kontrollissa primaarivasta-aine voidaan korvata esimerkiksi puskurilla. (Nukkarinen 2010: 82.) Opinäytetyössämme korvasimme negatiivisessa kontrollinäytteessä primaarivasta-aineen maitoblokkausliuoksella (5 % maito, 2% NGS ja 0,25% Triton X-100).

Lisäksi kontrolleina oli nollanäyte ja Mock-kontrolli. Näissä näytteissä ei saisi näkyä värjäytymistä. Nollanäyte käsiteltiin formaliinifikoimalla se heti, kun näyte oli saapunut FIMMlab:iin. Nollanäytteen eturauhaskudosta ei laitettu kudosisjelyyn eikä sitä sädetetty lainkaan. Mock-kontrollia ei myöskään sädetetty, mutta se kulki sädetettävien näytteiden mukana sädetyslaitteelle ja oli kudosisjelyssä. Näillä kontrolleilla mitataan kuljetuksen aikana tapahtuvaa stressiä, johtuivatko vauriot sädetyksestä vai matkasta. Värjäysten onnistumista kontrolloitiin myös sillä, että värjäykset tehtiin kahdesta eri potilaasta. Näin tarkistettiin värjäysten toistettavuus.

## 6.2 Näytteiden laadunvalvonta

Immunohistokemialla on nykyään olennainen asema tautien diagnostiikassa, ennustamisessa ja tutkimuksissa, joten immunohistokemiallisten menetelmien tarkkuus ja luotettavuus ovat tärkeitä tekijöitä. Värjäysten toistettavuus ja luotettavat tulokset ovat vaatimuksena ajan ja rahan säästämisen kannalta. Menetelmien standardisointi ei välttämättä ole yhtenäinen laboratorion toiseen, mutta värjäysprosessi ja menetelmät pitää olla vakiintuneet yksittäisissä laboratorioissa. Värjäysprosessi pitää suorittaa samalla tavalla joka värjäyskerralla. Värjäysprosessi tulee myös dokumentoida joka kerta, jotta voidaan jäljittää värjäyksessä tapahtuneet virheet. Dokumentoinnin tulee sisältää käytetyt vasta-ainepitoisuudet ja miten ne valmistettiin, lämpötilat, inkubaatioajat sekä käytetyt liuokset ja niiden pH-arvot. (Sanderson – Zardin 2013: 435.)

Fiksaatiolla on vaikutusta immunohistokemiassa, koska suurin osa antigeeneistä muuntuu prosessin aikana. Formaliinia käytetään yleensä fiksaatiossa, vaikka se voi tuoda haasteen joidenkin antigeenien osoittamisessa. (Sanderson – Zardin 2013: 435–436.) Opinnäytteessämme näytemateriaalina toimii parafiiniin valetut formaliinifiksoidut näytteet. Useimmat kaupallisista diagnostisista vasta-aineista toimivat hyvin tässä materiaalissa. Formaliinifiksaation aika vaikuttaa vasta-aineiden toimivuuteen merkittävästi. Pitkä fiksaatioaika heikentää antigeenin tunnistusta. (Mäkinen – Stenbäck. 2012: 1141.)

On olemassa hyviä antigeenin paljastusmenetelmiä, joilla antigeenit voidaan palauttaa fiksaation jälkeen. Antigeenin paljastuksessa tulee huomioida käytettävä menetelmä, puskuri, pH -arvo, lämpötila ja lämmityksen, inkubaation sekä jäädytyksen aika. (Sanderson – Zardin 2013: 435–436, 444.)

Kudoskuljetuksen laatu riippuu eri vaiheiden kestosta ja lämpötilasta. Liian korkea lämpötila on haitallinen antigeeneille, jotka ovat herkkiä lämmölle. Tällöin suositellaan käytettävän parafiinia, jolla on alhainen sulamispiste. Kudosten leikkaaminen ja lasille kiinnittyminen onnistuvat parhaiten, jos kudoskuljetuksessa dehydraatio ja parafiinin imeytys on tehty oikein. Tarpeeksi pitkä dehydraatio ja parafiinin imeytys parantavat myös immunohistokemiallisten värjäysten onnistumista. (Sanderson – Zardin 2013: 436–437.)

Leikkeen mikroskopointi on immunohistokemiallisten värjäysten keskeinen mutta haastavin osa. Kaikki edellä mainitut toimenpiteet vaikuttavat leikkeiden laatuun ja sitä kautta mikroskooppiseen tarkasteluun. Kromogeenisen saostuman määrä leimaavaan entsyymiin, ja sitä kautta reaktion intensiteettiin, on verrannollinen antigeenin määrään näytteessä. Kaikki solut eivät sisällä samaa määrää antigeenia ja eivät siksi värjäänny samalla intensiteetillä. (Jackson 2007: 221–222.) Opinnäytetyössä käytimme kahta eri mikroskooppia: GWB BH-2 OLYMPUS ja BMLB-Leica. Lopullisten tulosten tarkastelussa ja tulosten kuvien ottamiseen käytimme ainoastaan BMLB-Leica -mikroskooppia.

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä vasta-aineen optimaalinen laimennos, antaa spesifisen värjäystuloksen ilman epäspesifistä taustavärjäntymistä. Optimaalinen vasta-ainelaimennos riippuu fiksaation ajasta, kudosprosessoinnista ja antigeenin paljastukseen käytetystä menetelmästä (Jackson 2007: 217–218; af Hällström 2013). Vasta-aineen säilytyslämpötila on tärkeä vasta-aineen säilyvyyden kannalta (Sanderson – Zardin 2013: 438). Opinnäytetyössä käytimme vasta-aineena  $\gamma$ H2AX:ää, jota säilytettiin jääkaappilämpötilassa (+4 °C) ja pilkottu kaspasasi-3:a, jota säilytettiin pakastimessa (-20 °C).

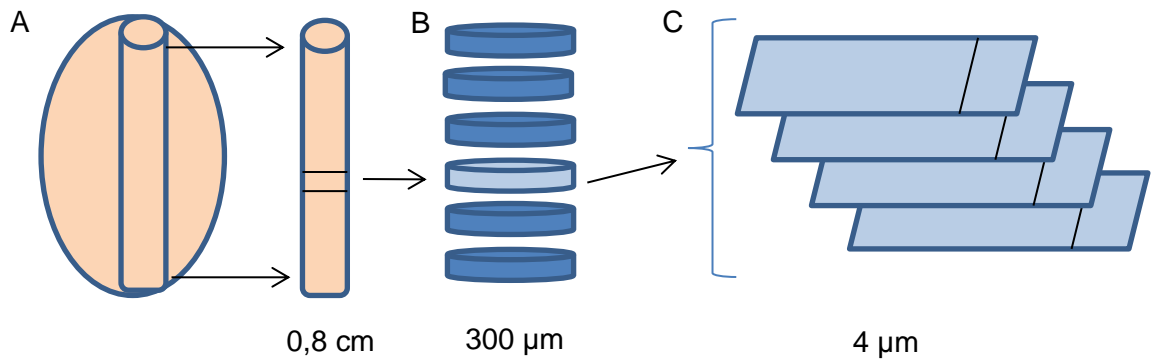
## 7 Värjäykset

Tässä kappaleessa käsittelemme opinnäytetyömme näytekäsittelyvaiheet: aina kudoksen verenkierrosta irrottamisesta valmiiseen värjättyyn leikkeeseen. Käymme läpi värjäysten preanalyttiset ja analyttiset työvaiheet.

## 7.1 Kudosnäytteiden valmistaminen värjäystä varten

Opinnäytetyössämme käytetyt eturauhaskudokset saatiin Peijaksen sairaalaan eturauhasen poistoon tulevilta potilailta. Kun eturauhasen poisto oli tehty, eturauhanen haettiin laboratorioon. Laboratoriossa eturauhanen punnittiin sekä värjättiin pinnasta oikea puoli vihreällä ja vasen keltaisella. Tämän jälkeen eturauhanen leikattiin kolmeen osaan, apexiin, keskiosaan ja basikseen. Jäljelle jäävästä keskiosasta porattiin lieriötä (kuvio 8 A). Meidän tutkimukseen lieriöt porattiin hyvänlaatuisesta (benignistä) kudoksesta, mutta muihin tutkimuksiin voidaan käyttää myös malignia kudosta. Peijaksesta kudoslieriöt kuljetettiin FIMM:iin. Kudosten kuljetus tapahtui taksilla kuljetusmediumissa, jäällä.

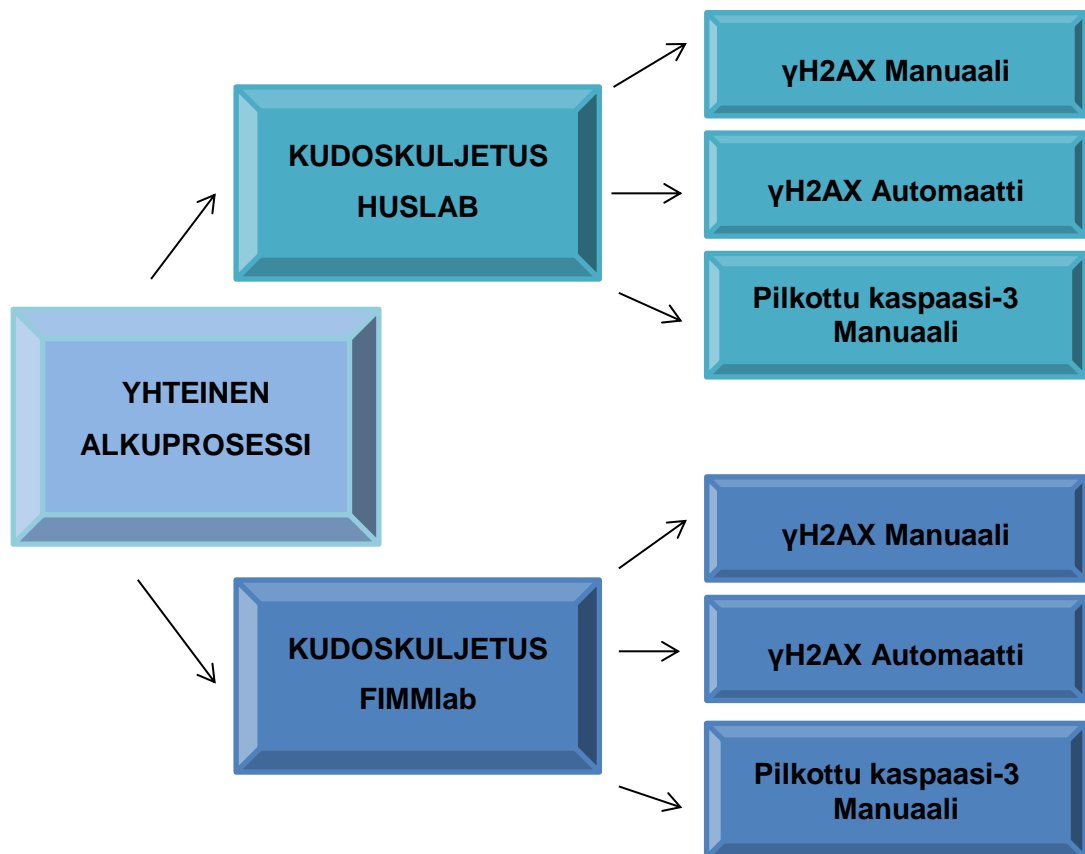
FIMM:ssä kudoslieriöt siivutettiin 300 µm paksuisiksi leikkeiksi kudisleikkurilla. Kudospalat asetettiin titaaniverkalle, joka oli seerumivapaassa, kasvatustekijöillä rikastetussa RPFM-4A kudosviljely mediumissa. Tämän jälkeen kudospalat säteilytettiin <sup>137</sup>Cs:lla (10 Gy), Kontrolleiksi tarkoitetut kudospalat jätettiin kuitenkin sädeittämättä (Mocknäytteet). Sädeilyn jälkeen titaaniverkko kudospaloiheen laitettiin kudosviljelyyn (kuvio 8 B). Viljely tapahtui pyörivällä jalustalla + 37 °C:ssa ja 5 % CO<sub>2</sub>:ssa, jossa viljelymedium huuhtoi välillä kudosta, eikä kudokset olleet upoksissa nesteessä. Kudospalat olivat siis ilman ja nesteen interfaasissa. Sädetetyt ja kontrolli -kudospalat olivat viljelyssä käsittelyn jälkeen eripituisia aikoja. Osa näytteistä oli yhden tunnin, toiset neljä tuntia ja kolmannet 24 tuntia kudosviljelyssä. Tämän jälkeen kudospalat laitettiin formaliinin fiksoitumaan yön yli. Fiksoitumisen jälkeen kudokset vietiin kuduskuljettimeen joko HUS-LAB:iin (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorio) tai FIMMlab:iin (Suomen molekyyli lääketieteen instituutin laboratorio). Kuduskuljetuksen jälkeen kudokset valettiin parafiiniblokkeihin. Parafiiniblokeista leikattiin mikrotomilla 4 µm paksuisia leikkeitä lasille (kuvio 8 C). Leikkeet kiinnitettiin lasille lämpölevyllä, jonka jälkeen ne laitettiin pakastimeen odottamaan värjäystä.



Kuvio 8. A Prostatasta porattiin lieriö. B Lieriö siivutettiin 300 µm paksuisiksi leikkeiksi, käsiteltiin (Mock ja IR) ja viljeltiin. C Parafiiniblokeista leikattiin mikrotomilla 4 µm paksuisia leikkeitä lasille (mukaillen Jäämaa ym. 2010).

## 7.2 Värjäysten eteneminen

Histologisen kudospesoinnin jälkeen vuorossa oli immunohistokemialliset värjäykset, jotka suoritimme itse. Manuaalivärjäyksiä tehtiin sekä  $\gamma$ H2AX että pilkottu kaspasi-3 -vasta-aineilla HUSLAB:ssa ja FIMMLab:ssa kuduskuljetetuista näytteistä. Lisäksi  $\gamma$ H2AX-vasta-aineella tehtiin automaattivärjäyksiä HUSLAB:ssa ja FIMMLab:ssa kuduskuljetetuista näytteistä (kuvio 9).



Kuvio 9. HUSLAB:ssa ja FIMMlab:ssa kuduskuljetetuista näytteistä tehdyt värjäykset.

Kaikki värjäykset alkoivat ja loppuvat samalla tavalla mutta keskivaiheessa värjäyksissä oli eroja (Kuvio 10). Ensin värjättävät näytteet otettiin pakastimesta pois värjäystä edeltävänä päivänä. Laseihin kirjoitettiin käytettävän vasta-aineen nimi, vasta-ainepitoisuus, värjäyspäivämäärä ja värjääjän nimi. Tämän jälkeen lasit laitettiin lämpökaappiin (+37 °C) yöksi kudosten kiinnittämiseksi lasille ja parafiinin poistamisen helpottamiseksi. Seuraavana päivänä voitiin aloittaa värjäykset. Lasit laitettiin telineeseen, jota pystyttiin upottamaan 250 ml:n astioihin kussakin värjäyksen vaiheessa. Vastaaine sekä DAB-inkubaatiot tehtiin kuitenkin kaukalossa. Automaatissa lasit olivat koko ajan lappeellaan automaatin omista telineissä.

Jotta kudokset voidaan värjätä, parafiini täytyy poistaa liuottimella (Deparafinisaatio). Yleisesti tarkoitukseen käytetään ksyleeniä. (Ross – Pawlina 2011: 2.) Työssämme käytettiin kuitenkin Tissue-Clear:ia, kaupallista vastaavaa liuotinta. Ksyleeniin verrattuna se on hajuton eikä ärsytä ihoa ja limakalvoja. (Tissue-Clear Sakura 2013.) Parafiinin poiston jälkeen lasit rehydroidaan laskevalla alkoholisarjalla (Ross – Pawlina 2011: 2).

Rehydraation jälkeen vuorossa oli endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden poisto vetyperoksidissa ( $H_2O_2$ ). Vetyperoksidi tehtiin laimentamalla 30-prosenttista  $H_2O_2$ :a ionivaihdettuun veteen (MQ). Tämän jälkeen lasit huuhdeltiin MQ-vedellä ja fosfaattipuskuroidussa keittosuolassa (PBS). Pesujen jälkeen vuorossa oli antigeenin paljastus PT-moduulissa. PT-moduulissa käytettävä sitraattipuskuri saatiin lisäämällä 150 ml kymmenenkertaista sitraattipuskuria 1350 ml MQ-veteen. Seuraavaksi vuorossa oli huuhtelu PBS-pesupuskurissa. Tämän vaiheen jälkeen värjäykset erosivat toisistaan riippuen oliko kyseessä manuaali- vai automaattivärjäys.

Manuaalivärjäyksessä oli seuraavaksi vuorossa maitoblokkaus. Maitoblokki valmistettiin steriiliin ionivaihdettuun veteen. Maitoblokki sisälsi 5 % rasvatonta maitojauhetta (Valio), 2 % normaalia vuohen seerumia (NGS Dako) ja 0,25 % Triton X-100:aa (Sigma Aldrich). Blokkkaus suoritettiin kaukalossa lasien ollessa lappeeltaan jolloin niihin pipetoitiin blokkausliuos. Tämän jälkeen blokkausliuos poistettiin koputtamalla lasin alareunaa paperiin. Seuraavaksi pipetoitiin primaarivasta-aineet.  $\gamma$ H2AX-vastaainelaimennokset tehtiin käyttämällä laimennossarjaa pienissä vastaainepitoisuuksissa ja pilkottu kaspasii-3 -vastaainelaimennokset tehtiin ilman laimennossarjoja. Kaikki vastaainelaimennokset tehtiin maitoblokkausliuokseen. Esimerkiksi laimennoksessa 1:5000 oli 1  $\mu$ l vasta-ainetta ja 5000  $\mu$ l maitoblokkia.

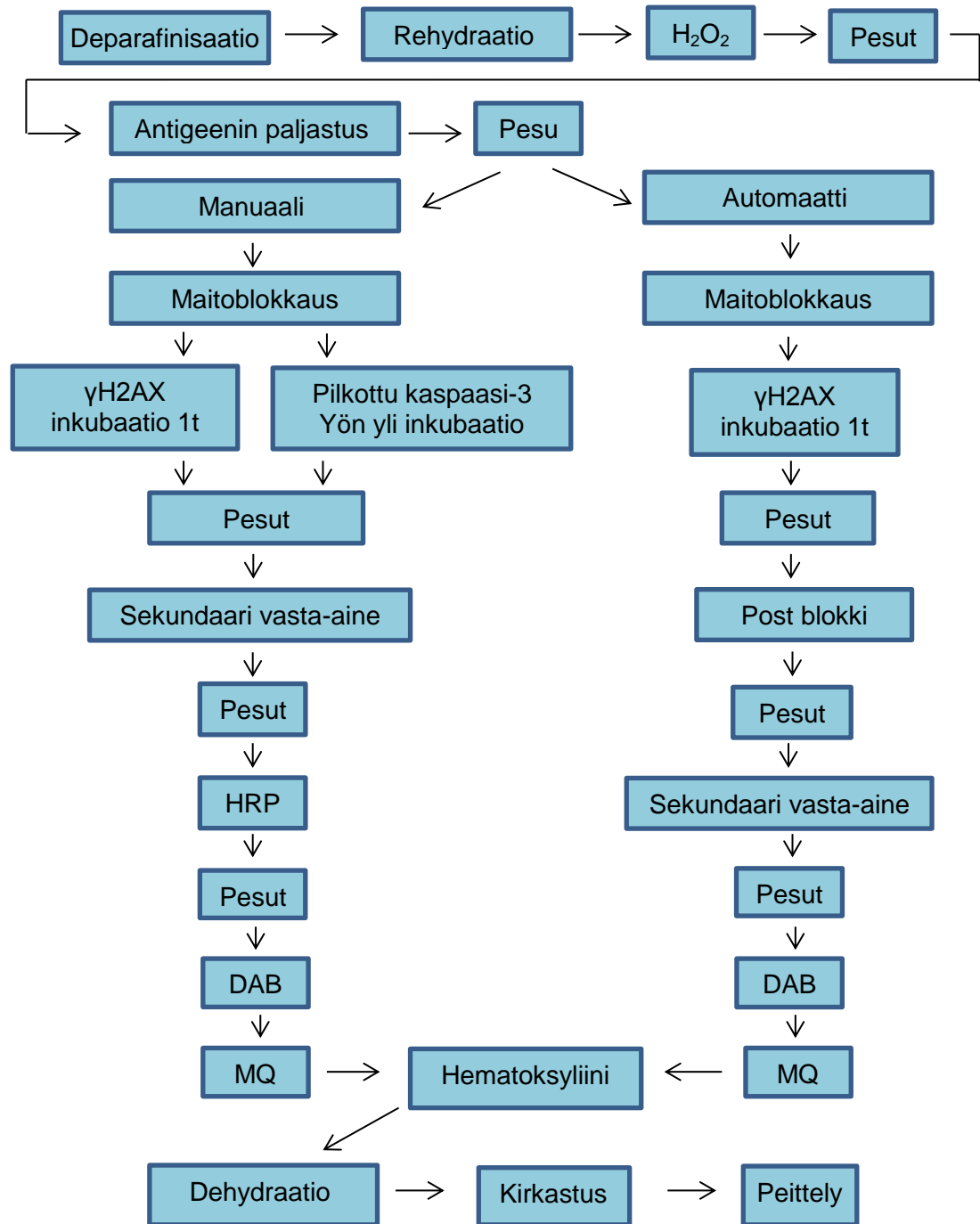
$\gamma$ H2AX:n annettiin inkuboitua tunnin huoneenlämmössä kun taas pilkottu kaspasii-3:n annettiin inkuboitua yön yli jääkaapissa (+4 °C). Inkubaation jälkeen ylimääräinen primaarivasta-aine poistettiin koputtamalla lasia paperiin ja huuhtelemalla PBS:ssä. Sitten lasit inkuboitiin biotinyloidulla sekundaarivasta-aineella. Sitten ylimääräinen vasta-aine poistettiin lasilta ja HRP-leimattu streptavidini lisättiin lasien päälle. Jälleen ylimäärä poistettiin lasilta ja vuorossa oli DAB, joka pipetoitiin laseille vetokaapissa sen karsinogeenisyyden vuoksi. Inkubaation jälkeen ylimääräinen DAB kaadettiin omaan jäteastiaan, jonka jälkeen lasit vielä laitettiin MQ -veteen.

Seuraavaksi vuorossa oli hematoksyliinivärjäys. Tämän jälkeen ylimääräinen väri poistettiin juoksevassa hanavedessä. Lopuksi oli vuorossa vedenpoisto (dehydraatio) ja kirkastus (Tissue-Clear). Näiden jälkeen lasit voitiin peitellä peitinlasilla. Kun peiteltyt lasit olivat kuivuneet vetokaapissa, ne olivat valmiita mikroskopoitavaksi.

Automaattivärjäys tehtiin myös manuaalisesti deparafinisaatiosta PT-moduliin. Automaattivärjäykseen menevät lasit siirrettiin tämän jälkeen Autostainer -

värjäysautomaattiin. Automaatissa vaiheet etenivät maitoblokista MQ -veteen samalla lailla kuin manuaalivärjäyksessä. Automaattimenetelmä erosi sillä, että manuaalin sekundaarivasta-aineen ja HRP -leimatun streptavidinin tilalla oli postblock ja sekundaarivasta-aine (sekundaarivasta-aineessa on HRP-polymeerissä kiinni). Postblock ja sekundaarivasta-aine reagenssit varmistavat polymeeri-HRP -vasta-aineiden konjugoinnin kontrolloidun polymerisaatiotekniikan avulla (BrightVision + 2013). Automaatissa pesut tehtiin PBS-Tweenillä eikä pelkästään PBS:llä. MQ:n jälkeen lasit poistettiin automaatista ja värjäystä jatkettiin manuaalisti hematoksyliinistä eteenpäin kuten manuaalimenetelmässä.





Kuvio 10. Värjäysprosessien kulku.

### 7.3 Pesut

Pesuilla saadaan poistettua ylimääräiset reagenssit (Pace 2008: 112). Pesuilla myös estetään antigeeni-vasta-aine -kompleksien syntyminen ja saostuminen. Antigeeni-

vasta-aine- kompleksit aiheuttaisivat taustavärjäytymistä ja haittaavat värjäysten tulkin-  
taa. Tästä syystä on tärkeää poistaa sitoutumaton vasta-aine ennen seuraavan rea-  
genssin lisäämistä. (Jackson – Blythe 2013: 405.) Opinnäytetyössämme käytettävä  
fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) on yleisesti käytössä oleva pesupuskuri. Detergen-  
tin kuten, TWEEN-20:n lisäys pesuliuokseen vähentää epäspesifistä taustavärjäytymis-  
tä. (Pace 2008: 112–113.) TWEEN-20 pienentää pintajännitystä ja mahdollistaa pesu-  
liuoksen leviämisen lasille, jolloin taustavärjäytyminen vähenee (af Hällström 2013).  
Tween-pesupuskuria käytettiin ainoastaan automaattivärjäyksessä (PBS + 0,5 %  
Tween). Kaikki käytössä olleet liuokset tehtiin Milliporen ultrapuhtaaseen ionivaihdet-  
tuun MQ -veteen.

## 8 Tulokset

Tulokset on käsitelty jokaiselle menetelmälle ja värjäyskerralle erikseen. FIMM:ssä  
γH2AX-värjäyksiä oli ennen tehty vasta-ainepitoisuudella 1:4000. Aloitimme kaikki  
γH2AX-värjäykset lisäämällä yhden suuremman ja useamman pienemmän vasta-  
ainepitoisuuden alkuperäisen lisäksi. γH2AX-värjäyksissä oli aina mukana näytteet IR  
1h, IR 4h ja IR 24h ja niiden Mock-kontrollit. Mukana olivat aina myös nollanäytteet.  
Lisäksi värjäsimme negatiiviset kontrollinäytteet.

Aiemmin suoritetuissa värjäyksissä FIMM:ssä oli vasta-ainepitoisuus pilkotun kaspaa-  
si-3:n osalta ollut 1:500, joten värjäykset aloitettiin haarukoimalla vasta-ainetasoa neljällä  
vasta-ainepitoisuudella. Värjäykset aloitettiin näytteillä IR 24h ja niiden Mock-kontrolli  
näytteillä. Ensimmäisellä värjäyskerralla mukana olivat myös nollanäytteet.

Tulososion kuvasarjoista jokainen sarja on katsottava erikseen, eikä niitä voi verrata  
keskenään, koska värjäykset ovat tehty eri värjäyskerroilla. Tulosten selkeyttämisen  
vuoksi värjäytystä laseista valitsimme vain osan kuvattavaksi, koska muuten kuvia olisi  
liian paljon. γH2AX-kuvasarjoissa vasemmalla puolella kuvat ovat Mock 1h -näytteitä,  
joista seurattiin värjäyksen onnistumista ja taustavärjäytymistä. Oikealla puolella ovat  
sädetetyt IR 1h -näytteet. Pilkottu kaspaa-3 näytteiden kuvissa Mock 24h -näytteet  
ovat vasemmalla puolella ja IR 24h -näytteet oikealla puolella.

## 8.1 γH2AX HUSLAB manuaalivärjäys

Ensimmäinen värjäyskerta (HUSLAB γH2AX manuaalivärjäys) tehtiin näytteellä HUB.A. γH2AX:n vasta-ainepitoisuuksina olivat 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000 ja 1:8000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 1).

Taulukko 1. Ensimmäisen HUSLAB γH2AX manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:3000	Liian voimakas värjäytyminen
1:4000	Liian voimakas värjäytyminen
1:5000	Liian voimakas värjäytyminen
1:6000	Liian voimakas värjäytyminen
1:8000	Liian voimakas värjäytyminen

Kaikilla γH2AX:n vasta-ainepitoisuuksilla tuli liian voimakkaasti värjäytymistä, joten päätimme ottaa pienempiä vasta-ainepitoisuuksia seuraavaan värjäyskertaan.

Toisella värjäyskerralla jatkoimme näytteellä HUB.A. Vasta-ainepitoisuuksiksi valittiin 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Värjäyksestä saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 2).

Taulukko 2. Toisen HUSLAB γH2AX manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:10 000	Sopiva värjäytyminen
1:20 000	Liian heikko värjäytyminen
1:30 000	Liian heikko värjäytyminen
1:40 000	Liian heikko värjäytyminen

Värjäysten perusteella valitsimme parhaaksi vasta-ainepitoisuudeksi 1:10 000. Seuraavaksi päätimme tarkistaa saadun tuloksen toisen potilaan näytteellä.

Kolmannella värjäyskerralla vaihdoimme näytteeksi HUB.B. Tällä värjäyksellä varmistimme näytteellä HUB.A saadun tuloksen. Vasta-ainepitoisuudet olivat 1:4000, 1:6000,

1:8000, 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 3).

Taulukko 3. Kolmannen HUSLAB  $\gamma$ H2AX manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.B.

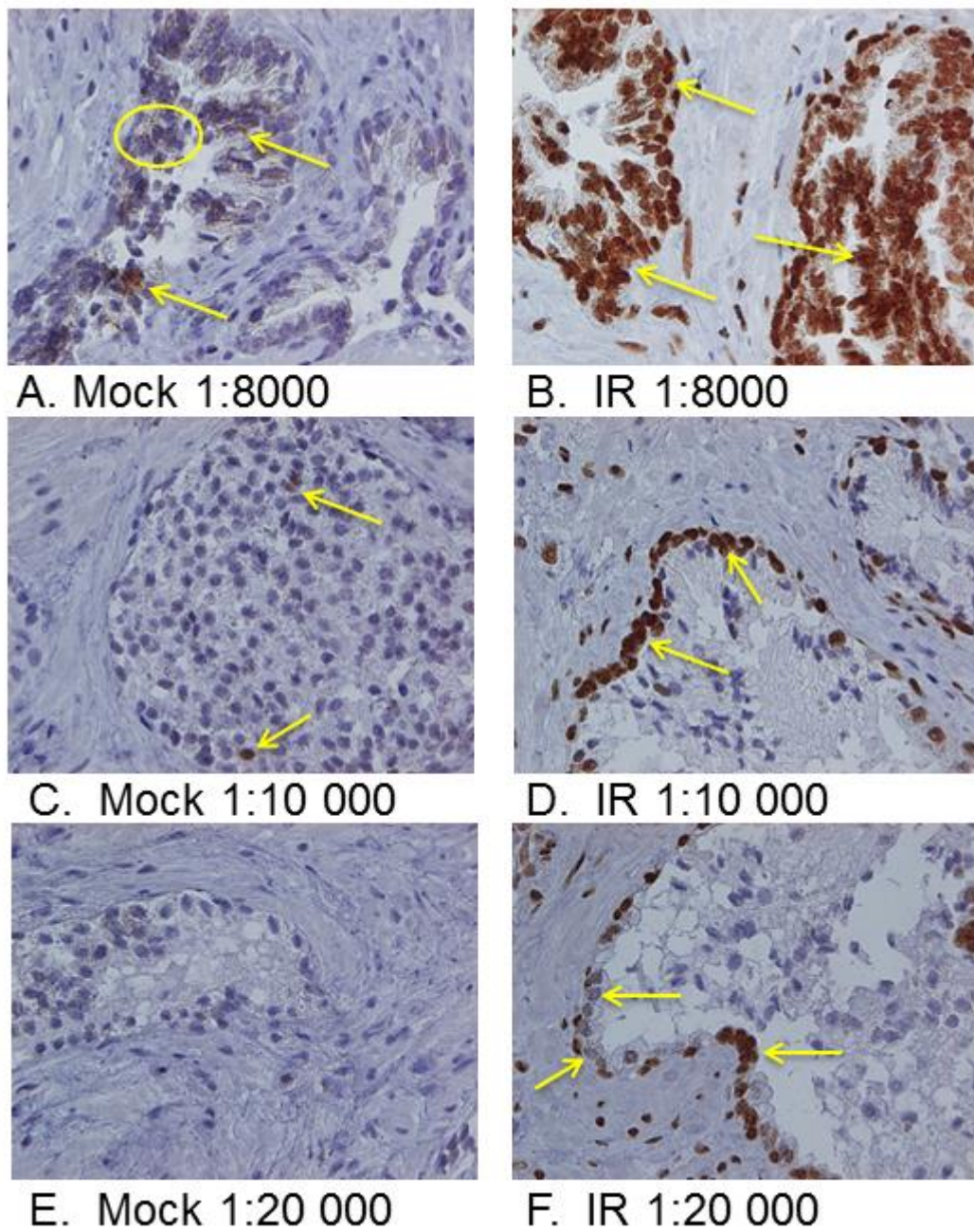
Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:4000	Liian voimakas värjäytyminen
1:6000	Liian voimakas värjäytyminen
1:8000	Aika hyvä värjäytyminen
1:10 000	Sopiva värjäytyminen
1:20 000	Liian heikko värjäytyminen
1:30 000	Liian heikko värjäytyminen
1:40 000	Liian heikko värjäytyminen

Vasta-ainepitoisuus 1:8000 oli aika hyvä, mutta epäspesifinen taustavärjäytyminen oli vahvaa. Vasta-ainepitoisuudessa 1:20 000 saatetaan kadottaa osa signaaleista, joten se oli liian heikko vasta-ainepitoisuus. Tämän perusteella parhaaksi vasta-ainepitoisuudeksi valittiin lopulta 1:10 000.

Seuraavassa kuvasarjassa on esitetty HUSLAB:n manuaalivärjäyksessä saatuja tuloksia (kuvio 11). Kun verrataan vasemman puoleisia Mock-näytteitä toisiinsa, huomataan, että kuvassa A on eniten ruskeaa taustavärjäytymistä. Havaitsemisen helpottamiseksi kuvaan A on merkitty joitakin taustavärjäytymisen kohtia nuolilla ja ympyrällä. Kuvassa C on vain kaksi pientä ruskeaa kohtaa (merkitty nuolilla). Alempi ruskea kohta voi olla spesifisesti värjäytynyt  $\gamma$ H2AX. DNA-vaurioita voi esiintyä myös spontaanisti Mock-käsitellyissä näytteissä. Kuvassa E taustavärjäytyminen on poissa.

Oikean puolen kuvista nähdään spesifin värin intensiteetti (sädetetyt näytteet). Vasta-ainepitoisuudessa 1:8 000 (kuva B) värjäytyminen on vahvaa, kaikki ruskea väri on spesifistä värjäytymistä (nuolilla on osoitettu voimakkaita värjäytymiskertymiä). Kuvassa IR 1:10 000 (kuva D) on ruskea spesifinen värjäytyminen vähäisempää kuin IR-näytteessä 1:8 000, mutta se on kuitenkin sopivan vahvaa. IR-näytteessä 1:20 000 nähdään vähemmän värjäytymistä kuin IR-näytteessä 1:10 000. Alemman vaakasuoran nuolen kohdalla spesifinen värjäytyminen on vahvimmillaan. Ylemmän vaakasuoran nuolen ja viiston nuolen kohdalla värjäytymistä ei enää ole, joten vasta-ainepitoisuus 1:20 000 on liian laimea tunnistamaan kaikkia  $\gamma$ H2AX-positiivisia soluja.

Parhaaksi vasta-ainepitoisuudeksi valittiin 1:10 000, koska siinä ei ollut taustavärjätymistä ja spesifinen värjätyminen oli sopivan voimakasta.



Kuvio 11.  $\gamma$ H2AX HUSLAB manuaalivärjätymisen kuvia Mock 1h ja IR 1h -näytteillä.

## 8.2 $\gamma$ H2AX HUSLAB automaattivärjäys

Ensimmäinen värjäys ( $\gamma$ H2AX HUSLAB automaattivärjäys) tehtiin näytenumerolla HUB.A. Vasta-ainepitoisuuksiksi valittiin 1:3000, 1:4000, 1:5000 ja 1:6000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 4).

Taulukko 4. Ensimmäisen HUSLAB  $\gamma$ H2AX automaattivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:3000	ei värjäytymistä
1:4000	ei värjäytymistä
1:5000	värjäytyminen
1:6000	värjäytyminen

Värjäytymisen pitäisi olla toisinpäin eli värjäytymisen kuuluisi olla vahvempaa suuremmissa  $\gamma$ H2AX:n vasta-ainepitoisuuksissa (1:3000 ja 1:4000) kuin pienemmissä vasta-ainepitoisuuksissa (1:5000 ja 1:6000). Koska näin ei ollut, värjäys oli epäonnistunut ja se täytyi uusida.

Toisella värjäyskerralla värjäykset tehtiin edelleen näytteestä HUB.A. Värjäykseen otettiin mukaan lisää pienempiä vasta-ainepitoisuuksia. Vasta-ainepitoisuuksiksi valittiin 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000, 1:8000, 1:10 000 ja 1:15 000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 5).

Taulukko 5. Toisen HUSLAB  $\gamma$ H2AX automaattivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:3000	Liian voimakas värjäytyminen
1:4000	Liian voimakas värjäytyminen
1:5000	Liian voimakas värjäytyminen
1:6000	Liian voimakas värjäytyminen
1:8000	Liian voimakas värjäytyminen
1:10 000	Liian voimakas värjäytyminen
1:15 000	Liian voimakas värjäytyminen

Värjäytyminen oli kaikilla γH2AX:n vasta-ainepitoisuuksilla todella voimakasta, joten päätettiin tehdä seuraavalla värjäyskerralla lisää pienempiä vasta-ainepitoisuuksia.

Värjäyksiä jatkettiin kolmannella värjäyskerralla edelleen näytteellä HUB.A. Vasta-ainepitoisuudet olivat 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 6).

Taulukko 6. Kolmannen HUSLAB γH2AX automaattivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:10 000	Liian voimakas värjäytyminen
1:20 000	Sopiva värjäytyminen
1:30 000	Sopiva värjäytyminen
1:40 000	Sopiva värjäytyminen

Sopiviksi γH2AX:n vasta-ainepitoisuuksiksi HUSLAB automaattivärjäykselle osoittautuivat vasta-ainepitoisuudet 1:20 000–1:40 000. Tässä värjäyksessä käytettävältä näytteeltä HUB.A puuttuivat sädetetyt IR 24h -näytteet. Värjäykset toistettiin toisen potilaan näytteillä, jotta saimme varmennettua tulokset.

Neljännellä värjäyskerralla siirryttiin toisesta potilaasta otettuun näytteeseen HUB.B. Vasta-ainepitoisuudet olivat 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 7).

Taulukko 7. Neljännen HUSLAB γH2AX automaattivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.B.

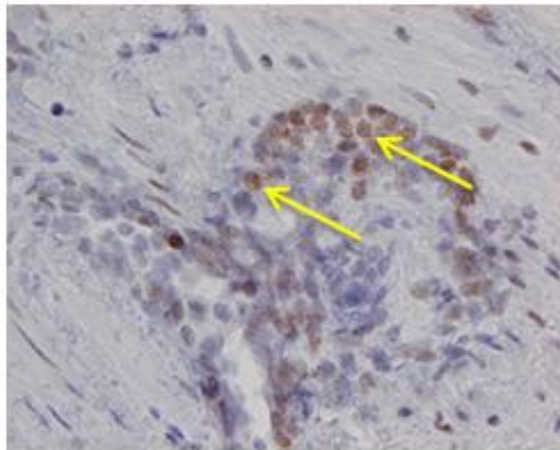
Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:4000	Liian voimakas värjäytyminen
1:6000	Liian voimakas värjäytyminen
1:8000	Liian voimakas värjäytyminen
1:10 000	Liian voimakas värjäytyminen
1:20 000	Sopiva värjäytyminen IR 1, IR 4 ja IR 24 -näytteissä
1:30 000	Sopiva värjäytyminen IR 1 ja IR 4 -näytteissä, liian heikko värjäytyminen IR 24 -näytteessä
1:40 000	Sopiva värjäytyminen IR 1 ja IR 4 -näytteissä, liian heikko värjäytyminen IR 24 -näytteessä

Parhaaksi  $\gamma$ H2AX:n vasta-ainepitoisuudeksi HUSLAB automaattivärjäyksessä saatiin 1:20 000. Mukaan otetuissa IR 24h -näytteissä tuli pienempi värisignaali kuin IR 1h ja IR 4h -näytteissä. Pienemmissä vasta-ainepitoisuuksissa kuin 1:20 000 olisi vaarana, että alhaisemmat signaalit eivät tulisi näkyviin IR 24h -näytteissä.

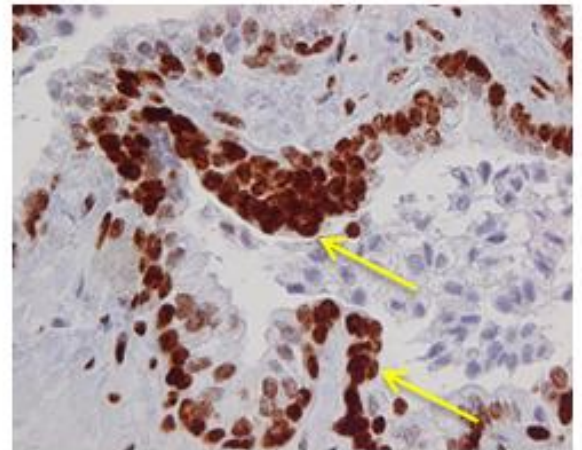
Seuraavassa kuvasarjassa HUSLAB automaattivärjäyksen tuloksia (kuvio 12). Vasemman puoleisessa Mock-näyterivissä nähdään epäspesifistä taustavärjäytymistä 1:10 000 -näytteessä (kuva A). Nuolilla on osoitettu värjäytymistä, jota ei saisi näkyä. 1:20 00 (kuva C) ja 1:30 000 (kuva E) näytteissä taustavärjäytyminen poistuu kokonaan.

IR-näyte 1:10 000 (kuva B) on värjäytynyt liian voimakkaasti. IR-näytteessä 1:20 000 (kuva D) värjäytyminen on sopivan voimakasta. Vaikka saimme myös hyvän värjäytymistuloksen IR 1h 1:30 000 -näytteellä, niin kuvaan (kuva F) on saatu kohta, missä värjäytyminen on ollut heikkoa.

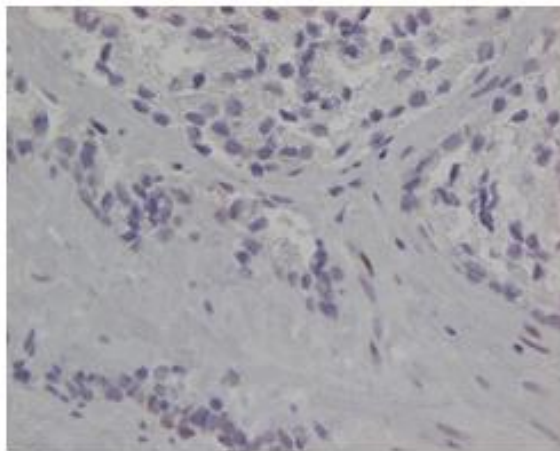




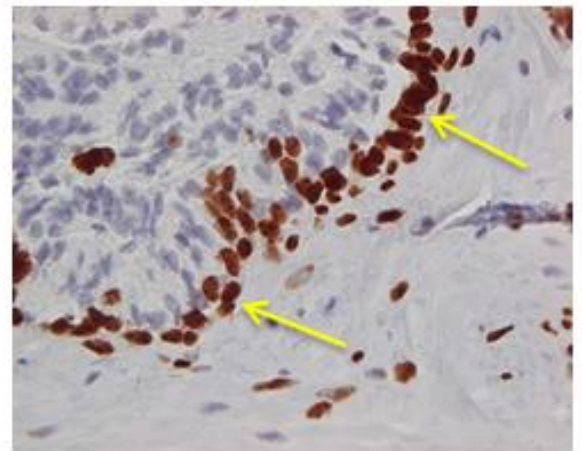
A. Mock 1:10 000



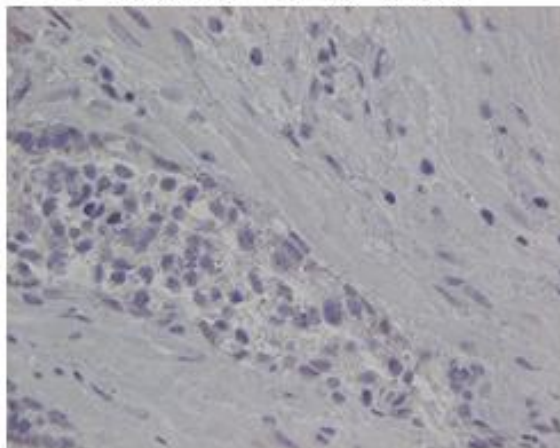
B. IR 1:10 000



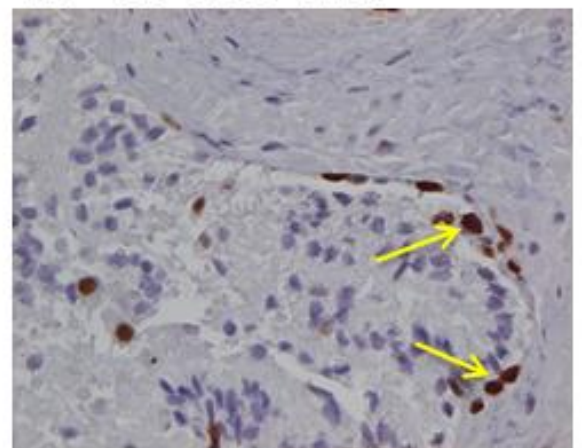
C. Mock 1:20 000



D. IR 1:20 000



E. Mock 1:30 000



F. IR 1:30 000

Kuvio 12.  $\gamma$ H2AX HUSLAB automaattivärjyksen kuvia Mock 1h ja IR 1h -näytteillä.

### 8.3 $\gamma$ H2AX FIMMLab manuaalivärjäys

Ensimmäisellä värjäyskerralla ( $\gamma$ H2AX FIMMLab manuaalivärjäys) aloitettiin näytteestä HUB.A. Käytettiin vasta-ainepitoisuuksia 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000 ja 1:8000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 8).

Taulukko 8. Ensimmäisen FIMMLab  $\gamma$ H2AX manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:3000	Liian voimakas värjäytyminen
1:4000	Liian voimakas värjäytyminen
1:5000	Liian voimakas värjäytyminen
1:6000	Liian voimakas värjäytyminen
1:8000	Liian voimakas värjäytyminen

Kaikkien  $\gamma$ H2AX -vasta-ainepitoisuuksien vahvasta värjäytymisestä johtuen päätettiin seuraavaan värjäykseen ottaa mukaan pienempiä vasta-ainepitoisuuksia.

Toisella värjäyskerralla jatkettiin värjäyksiä näytteellä HUB.A. Vasta-ainepitoisuuksina olivat 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 9).

Taulukko 9. Toisella FIMMLab  $\gamma$ H2AX manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:10 000	Sopiva värjäytyminen
1:20 000	Sopiva värjäytyminen
1:30 000	Sopiva värjäytyminen
1:40 000	Liian heikko värjäytyminen

Sopivia vasta-ainepitoisuuksia olivat 1:10 000-30 000. Päätimme tarkistaa tuloksen vielä toisen potilaan näytteillä.

Kolmannella värjäyskerralla vaihdettiin näytteeseen HUB.B. Vasta-ainepitoisuuksina olivat 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Värjäyksellä oli tarkoitus varmistaa näytteellä HUB.A saadut tulokset. Värjäys kuitenkin epäonnistui,

sillä värjäytyminen ei pienentynyt mentäessä suuremmasta vasta-ainepitoisuudesta pieneenpään. Lisäksi osa näytteistä oli tippunut pois lasilta, joten niistä ei voinut katsoa värjäytymistä. Tämä värjäys piti kokonaan uusia, jotta saataisiin luotettavia tuloksia.

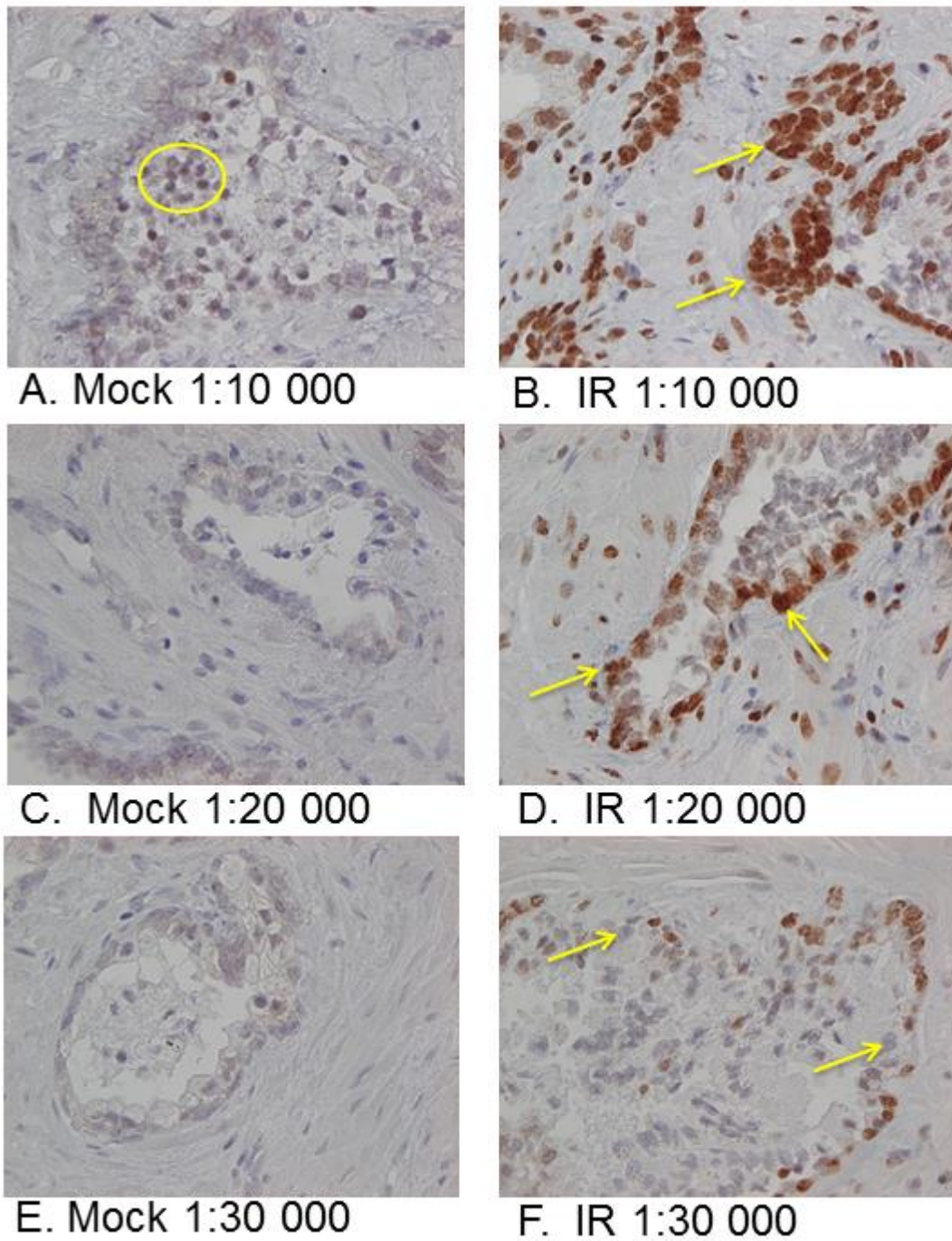
Neljännellä kerralla uusittiin värjäys näytteestä HUB.B. Vasta-ainepitoisuudet olivat 1:8000, 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 10).

Taulukko 10. Neljännen FIMMLab  $\gamma$ H2AX manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.B.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:8000	Liian voimakas värjäytyminen
1:10 000	Sopiva värjäytyminen
1:20 000	Sopiva värjäytyminen
1:30 000	Sopiva värjäytyminen
1:40 000	Liian heikko värjäytyminen

Hyviä vasta-ainepitoisuuksia olivat 1:10 000–1:30 000. Erot vasta-ainepitoisuuksien värjäytymisissä olivat pienet. Valitsimme kuitenkin yhden vasta-ainepitoisuuden värjäysmenetelmäohjeisiin. Vasta-ainepitoisuudessa 1:10 000 oli vähän enemmän taustavärjäytymistä kuin vasta-ainepitoisuuksissa 1:20 000 ja 1:30 000. Vasta-ainepitoisuudessa 1:30 000 spesifisen värjäytymisen intensiteetti laski hiukan verrattuna vasta-ainepitoisuuteen 1:20 000. Parhaaksi vasta-ainepitoisuudeksi valittiin 1:20 000, koska kaikki DNA-vaurioituneet solut tulivat värjäytyiksi ja taustavärjäytyminen oli vähäisempää kuin vasta-ainepitoisuudessa 1:10 000.

Seuraavassa kuvasarjassa on FIMMLab manuaalivärjäyksen tuloksia (kuvio 13). Vasemman puoleisista Mock-näytteistä vahvin taustavärjäytyminen oli näytteessä 1:10 000. IR 1h -näytteistä 1:10 000–1:30 000 -vasta-ainepitoisuudet olivat värjäytyneet kaikki hyvin. Kuvasarjassa on kuvia IR-näytteitä, josta huomataan, että vahvaa värjäytymistä oli näytteessä 1:10 000 (nuolien kohdat). Näytteessä 1:20 000 on lähes yhtä vahvaa värjäytymistä. Vaikka värjäyksen intensiteetti oli hyvä vasta-ainepitoisuudessa 1:30 000, jostakin kohtaa löytyi haaleampaa värjäytymistä (kuva F). Tämän perusteella vasta-ainepitoisuutta 1:30 000 ei valittu parhaimmaksi vasta-ainepitoisuudeksi. Kuvasarjassa F nuolien kohdalla ei enää ole värjäytymistä, joten vasta-ainepitoisuus 1:30 000 on liian laimea tunnistamaan kaikkia  $\gamma$ H2AX-positiivisia soluja.



Kuvio 13.  $\gamma$ H2AX FIMMLab manuaalivärjäyksen kuvia Mock 1h ja IR 1h -näytteillä.

#### 8.4 $\gamma$ H2AX FIMMLab automaattivärjäys

Ensimmäinen värjäys tehtiin näytteellä HUB.A. Vasta-ainepitoisuutena olivat 1:3000, 1:4000, 1:5000 ja 1:6000. Näytteet olivat olleet liian kauan PT-moduulissa, joten värjäys päätettiin uusia.



Toinen värjäys tehtiin myös näytteestä HUB.A. Vasta-ainepitoisuuksina olivat 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000, 1:8000, 1:10 000 ja 1:15 000. Saadut tulokset ovat taulukoituina (Taulukko 11).

Taulukko 11. Toisen FIMMlab  $\gamma$ H2AX automaattivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:3000	Liian voimakas värjäytyminen
1:4000	Liian voimakas värjäytyminen
1:5000	Liian voimakas värjäytyminen
1:6000	Liian voimakas värjäytyminen
1:8000	Liian voimakas värjäytyminen
1:10 000	Liian voimakas värjäytyminen, ei kuitenkaan niin vahvaa kuin 1:3000–1:8000
1:15 000	Liian voimakas värjäytyminen, ei kuitenkaan niin vahvaa kuin 1:3000–1:8000

Voimakkaan värjäytymisen takia päätettiin seuraavalla kerralla käyttää pienempiä  $\gamma$ H2AX -vasta-ainepitoisuuksia.

Kolmannella värjäyskerralla jatkettiin vielä näytteellä HUB.A. Vasta-ainepitoisuudet olivat 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Saadut tulokset ovat taulukoituina (Taulukko 12).

Taulukko 12. Kolmannen FIMMlab  $\gamma$ H2AX automaattivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:10 000	Sopiva värjäytyminen IR 24 -näytteessä, liian voimakas värjäytyminen IR 1 ja IR 4 -näytteissä
1:20 000	Sopiva värjäytyminen IR 1, IR 4 ja IR 24 -näytteissä
1:30 000	Sopiva värjäytyminen IR 1, IR 4 ja IR 24 -näytteissä
1:40 000	Liian heikko värjäytyminen

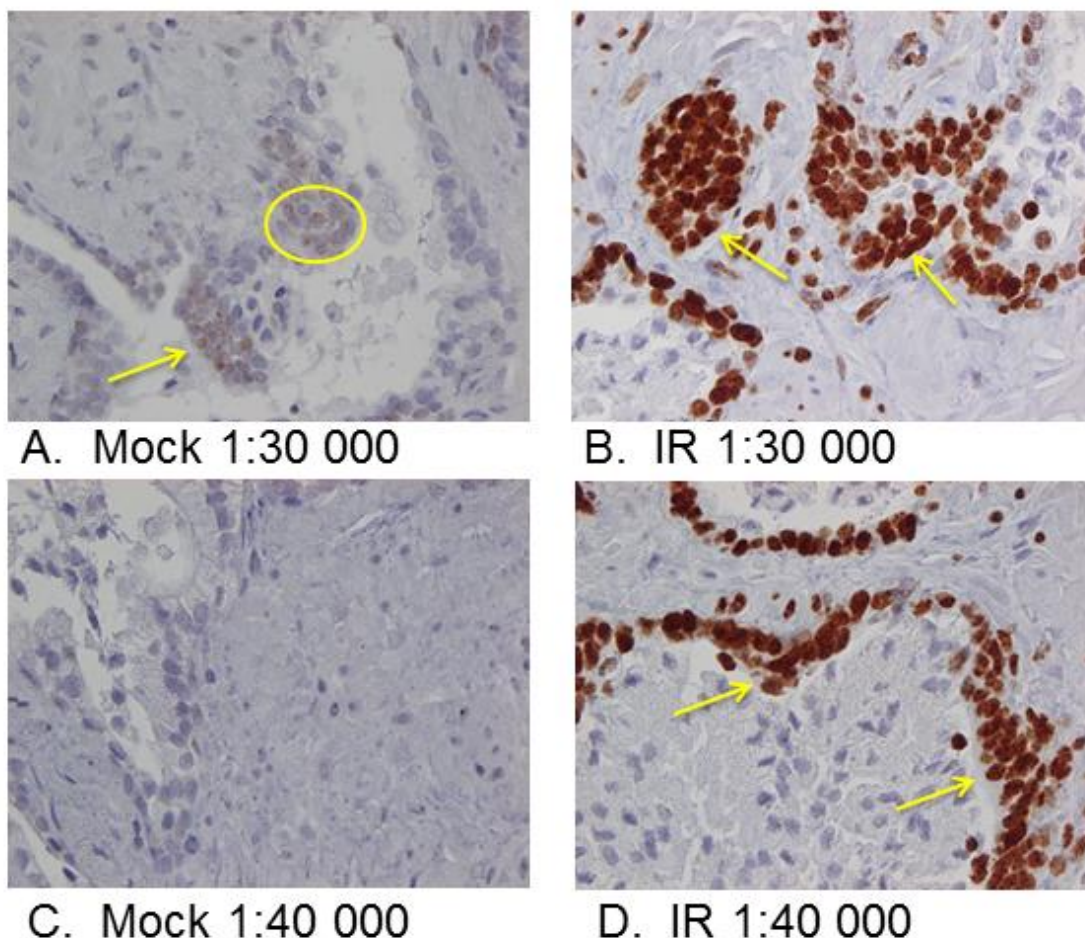
Sädetettyjen IR 1h ja IR 4h -näytteiden mukaan  $\gamma$ H2AX -vasta-ainepitoisuudet 1:20 000–1:30 000 olivat hyviä. IR 24h -näytteen kohdalla vasta-ainepitoisuudet 1:10 000–1:30 000 olisivat parhaat. Lopullisen vasta-ainepitoisuuden päättämiseen tarvitsimme vielä värjäyksen toisella näytteellä.

Neljännellä värjäyskerralla vaihdoimme näytteeseen HUB.B. Vaihtamalla näytettä pysytimme varmistamaan näytteen HUB.A saadut tulokset. Käytetyt vasta-ainepitoisuudet olivat 1:4000, 1:6000, 1:8000, 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 ja 1:40 000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (Taulukko 13).

Taulukko 13. Neljännen FIMMlab yH2AX automaattivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.B.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:4000	Liian voimakas värjäytyminen
1:6000	Liian voimakas värjäytyminen
1:8000	Liian voimakas värjäytyminen
1:10 000	Liian voimakas värjäytyminen
1:20 000	Liian voimakas värjäytyminen
1:30 000	Lähes sopiva värjäytyminen
1:40 000	Sopiva värjäytyminen

Vasta-ainepitoisuus 1:30 000 vaikutti sopivalta, mutta parhaaksi vasta-ainepitoisuudeksi valittiin kuitenkin 1:40 000, koska se antoi vähemmän epäspesifistä taustavärjäytymistä. Seuraavassa kuvasarjassa käsitellään FIMMlab automaattivärjäyksen tuloksia (kuvio 14). Mock-näytteistä 1:30 000 (kuva A) ja 1:40 000 (kuva C) huomataan, että taustavärjäytymistä on enemmän näytteessä 1:30 000. Taustavärjäytymistä voi tarkastella nuolella ja ympyrällä merkitystä kohdasta. IR-näytteessä 1:30 000 on vahvempaa värjäytymistä kuin näytteessä 1:40 000.



Kuvio 14.  $\gamma$ H2AX FIMMLab automaattivärjäyksen kuvia Mock 1h ja IR 1h -näytteillä.

### 8.5 $\gamma$ H2AX tulosten yhteenveto

Optimoinnin tuloksena  $\gamma$ H2AX:n vasta-ainepitoisuudeksi tuli HUSLAB:in manuaalivärjäyksessä 1:10 000 ja HUSLAB:in automaattivärjäyksessä 1:20 000. FIMMLab manuaalivärjäyksessä sopiva vasta-ainepitoisuus on 1:20 000 ja FIMMLab:in automaattivärjäyksessä 1:40 000. Valitessamme optimaalisia vasta-ainepitoisuuksia spesifisen värjäytymisen lisäksi valintaan vaikutti epäspesifisen taustavärjäytymisen määrä. Värjäyksissämme tarkistimme epäspesifisen taustavärjäytymisen kontrollinäytteistä. Suuremmisissa vasta-ainepitoisuuksissa oli yleensä enemmän taustavärjäytymistä kuin pienemmissä. Oli tärkeä saada tarpeeksi vahva spesifinen värjäystulos pienellä taustavärjäytymisellä.

## 8.6 Pilkottu kaspasi-3 HUSLAB manuaalivärjykset

Värjäyksissä (pilkottu kaspasi-3 HUSLAB manuaalivärjäys) käytettiin vain 24h näytteitä (Mock ja IR), koska aikaisemmillä aikapisteillä ei esiinny apoptoosia. Ensimmäisellä värjäyskerralla värjättiin myös nollanäyte. Ensimmäinen värjäys tehtiin näytteellä HUB.B vasta-ainepitoisuuksilla 1:500, 1:1500, 1:3000 ja 1:6000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 14)

Taulukko 14. Ensimmäisen HUSLAB pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset, näyte HUB.B.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:500	Liian voimakas värjäntyminen
1:1500	Sopiva värjäntyminen
1:3000	Heikko värjäntyminen
1:6000	Liian heikko värjäntyminen

Värjäyksessä huomattiin että alkuperäinen pilkottu kaspasi-3 -vasta-ainepitoisuus 1:500 oli liian voimakas. Se antoi paljon epäspesifistä taustaa. 1:1500 oli paras vasta-ainepitoisuus. Suuremmat vasta-ainepitoisuudet osoittautuivat liian laimeiksi.

Seuraavaksi päätettiin varmistaa asia vasta-ainepitoisuuksilla 1:1500, 1:2500 ja 1:3000, samalla potilaalla. Ensimmäisellä värjäyskerralla päätettiin myös että nollanäytteet jätetään kokonaan pois koska niissä ei näkynyt mitään oikeaa värjäntymistä.

Toisella värjäyskerralla värjättiin myös HUB.B näytteet. Saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 15).

Taulukko 15. Toisen HUSLAB pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset, näyte HUB.B.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:1500	Sopiva värjäntyminen, hieman haalea
1:2500	Sopiva värjäntyminen, hieman parempi kuin 1:1500
1:3000	Heikko värjäntyminen



Värjäyksissä huomattiin että näytteen HUB.B paras pilkottu kaspasi-3:n vasta-ainepitoisuus oli 1:2500. Päätettiin jatkaa värjäyksiä näytteellä HUB.A vasta-ainepitoisuuksilla 1:1500 ja 1:2500.

Kolmannella värjäyskerralla vaihdettiin näytteeseen HUB.A. Saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 16)

Taulukko 16. Kolmannen HUSLAB pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset, näyte HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:1500	Sopiva värjäytyminen
1:2500	Sopiva värjäytyminen, hieman parempi kuin 1:1500

Värjäyksissä huomattiin että näytteessä HUB.A pilkottu kaspasi-3 vasta-ainepitoisuus 1:2500 oli paras. Tulosten varmistamiseksi päätettiin vielä uusia värjäykset näytteellä HUB.A ja HUB.B vasta-ainepitoisuuksilla 1:2500 ja 1:5000.

Neljännellä värjäyskerralla saatiin seuraavat tulokset näytteen HUB.B osalta. Saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 17)

Taulukko 17. Neljännen HUSLAB pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset näyte HUB.B.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:2500	Sopiva värjäytyminen
1:5000	Heikko värjäytyminen

Neljännellä värjäyskerralla näytteestä HUB.A, saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 18)

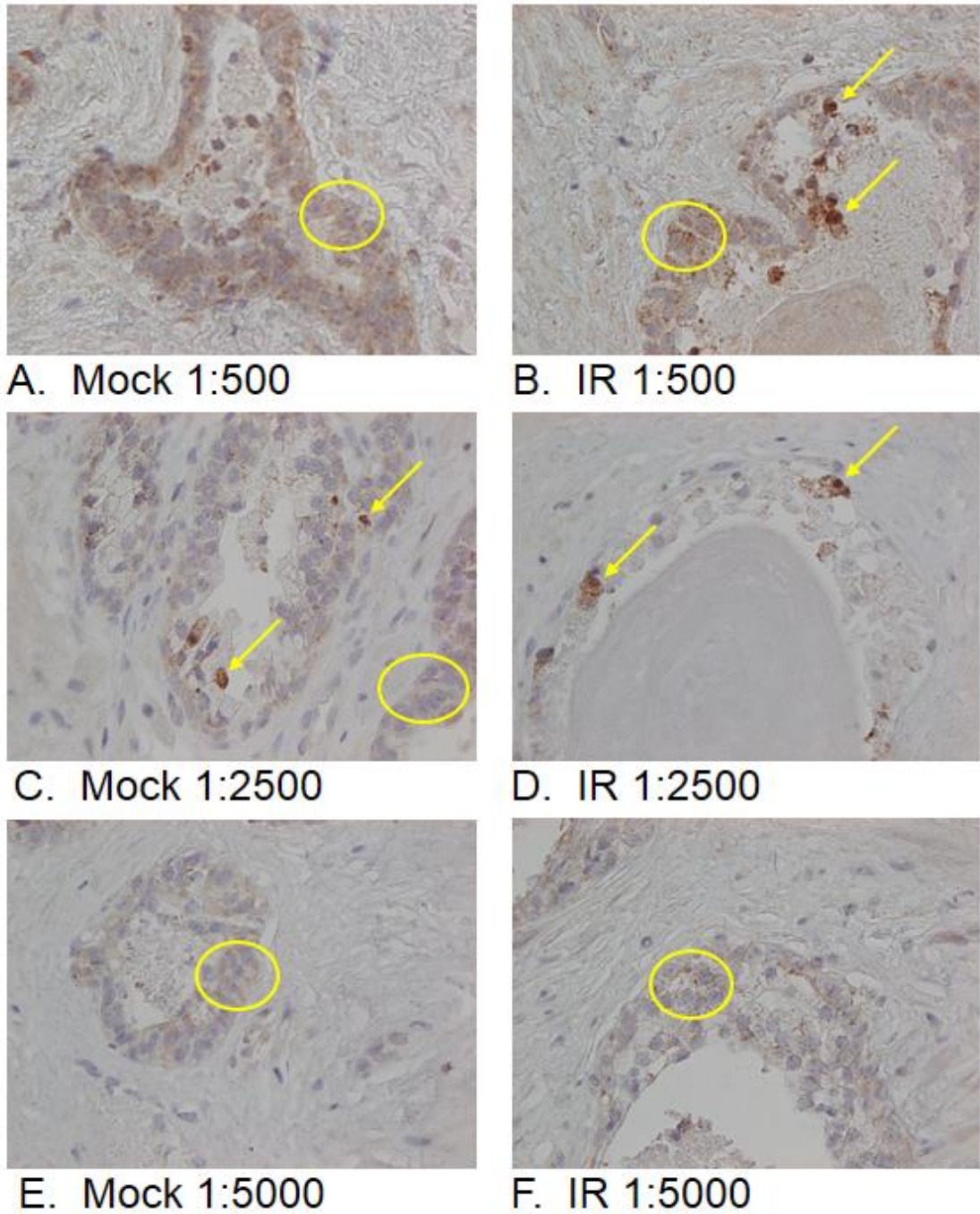
Taulukko 18. Neljännen HUSLAB pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset näyte HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:2500	Sopiva värjäytyminen
1:5000	Heikko värjäytyminen

Neljännen HUSLAB värjäyksen näytteillä HUB.B ja HUB.A pilkottu kaspasi-3 vasta-ainepitoisuus 1:2500 oli paras ja vasta-ainepitoisuus 1:5000 oli liian heikko.

Seuraavassa kuvasarjassa esitellään tulokset HUSLAB:ssa kuduskuljetetuista näytteistä näytteen HUB.B osalta 24h aikapisteessä (kuvio 15). Kuvista näkee että, vasta-ainepitoisuus 1:500 oli todella voimakas. Vasta-ainepitoisuus 1:5000 jäi hyvin laimeaksi. Vasta-ainepitoisuuden 1:2500 värjäystulos oli paras. Verrattaessa vasemmanpuoleisen rivin kuvia toisiinsa, näkee että Mock-näytteiden kesken on eroa. Vasta-ainepitoisuudessa 1:500 (kuva A) näkyy paljon epäspesifiä taustavärjäytymistä (kuvassa vaalean ruskeata värjäytymistä), joka on merkitty kuvaan ympyrällä. Vasta-ainepitoisuuksissa 1:2500 (kuva C) ja 1:5000 (kuva E) näkyy vähän taustavärjäytymistä Mock-näytteissä, joka on osoitettu kuvissa ympyrällä. Vasta-ainepitoisuudessa 1:2500 (kuva C) näkyy myös vähän positiivista värjäytymistä, joka on merkitty kuvaan nuolilla.

Sädetetyissä IR-näytteissä vasta-ainepitoisuudessa 1:500 (kuva B) näkyy oikeata värjäytymistä, joka on osoitettu kuvassa nuolilla, mutta myös hieman taustaa (ympyröity kuvaan). Vasta-ainepitoisuudessa 1:2500 (kuva D) näkyy selkeitä apoptoottisia soluja (osoitettu nuolilla) ja selkeästi vähemmän epäspesifistä taustaa. Laimennoksessa 1:5000 (kuva F) näkyy jonkin verran positiivista värjäytymistä, mutta spesifisen värjäytymisen voimakkuus on vähentynyt. Kuvassa F epäspesifinen taustavärjäytyminen on ympyröitynä.



Kuvio 15. Pilkottu kaspasi-3 HUSLAB kuduskuljetetut näytteet

Yleisesti ottaen pilkottu kaspasi-3 värjäys voi antaa paljon vähemmän positiivisia signaaleja kuin  $\gamma$ H2AX-värjäys. Tämä johtuu siitä, että työssä käytetty säteilyannos, ei saa aikaan mittavaa apoptoosia. Spontaanisti syntyneen apoptoosin takia pilkottu kaspasi-3-signaalia voi esiintyä myös Mock-näytteissä.

## 8.7 Pilkottu kaspasi-3 FIMMLab manuaalivärjykset

Ensimmäinen (pilkottu kaspasi-3 FIMMLab manuaalivärjäys) värjäys tehtiin näytteellä HUB.B vasta-ainepitoisuuksilla 1:1500, 1:2500, 1:3000 ja 1:6000. Saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 19)

Taulukko 19. Ensimmäisen FIMMLab pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.B

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:1500	Sopiva värjäntyminen
1:2500	Hieman liian heikko värjäntyminen
1:3000	Heikko värjäntyminen
1:6000	Liian heikko värjäntyminen

Vasta-ainepitoisuus 1:1500 osoittautui parhaaksi. Muut vasta-ainepitoisuudet olivat joko hieman laimeita tai liian laimeita. Päätettiin jatkaa värjäyksiä potilaalla HUB.A vasta-ainepitoisuuksilla 1:1500 ja 1:2500

Toinen värjäyskerta näytteellä HUB.A. Saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 20)

Taulukko 20. Toisen FIMMLab pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset näytteellä HUB.A.

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:1500	Sopiva värjäntyminen
1:2500	Heikko värjäntyminen

Spesifinen värjäntyminen (pilkottu kaspasi-3) vasta-ainepitoisuudessa 1:1500 oli hyvä kun taas vasta-ainepitoisuudessa 1:2500 spesifinen värjäntyminen oli vähäisempää. Näytteet antoivat ristiriitaisia tuloksia taustavärjäntymisen suhteen. Suurempi vasta-ainepitoisuus 1:2500 antoi enemmän epäspesifistä taustaa kuin pienempi 1:1500.

Epäspesifisen värjäntymisen takia päätettiin vielä uusia värjykset näytteellä HUB.A ja HUB.B laimennoksilla 1:2500 ja 1:5000.

Kolmannella värjäyskerralla näytteellä HUB.A saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 21)

Taulukko 21. Kolmannen FIMMLab pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset, näyte HUB.A

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:2500	Sopiva värjäntyminen
1:5000	Hieman liian heikko värjäntyminen

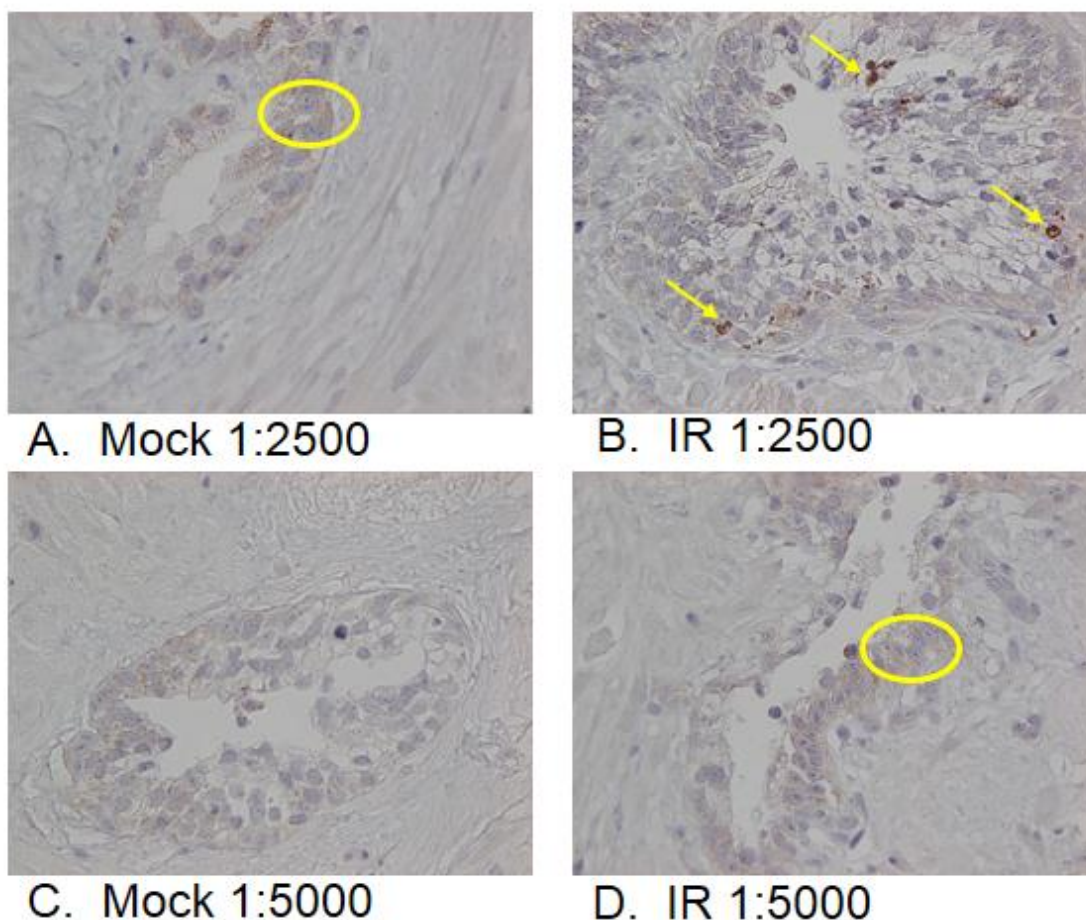
Kolmannella värjäyskerralla näytteellä HUB.B saadut tulokset ovat taulukoituna (taulukko 22)

Taulukko 22. Kolmannen FIMMLab pilkottu kaspasi-3 manuaalivärjäyksen tulokset, näyte HUB.B

Vasta-ainepitoisuus	Värjäystulos
1:2500	Sopiva värjäntyminen
1:5000	Heikko värjäntyminen

Värjäyksissä (pilkottu kaspasi-3) vasta-ainepitoisuus 1:2500 oli paras, sekä näytteessä HUB.A että HUB.B. Lisäksi molempien näytteiden osalta vasta-ainepitoisuus 1:5000 oli liian laimea.

Seuraavassa kuvasarjassa kuvat FIMMLab:in kuduskuljettamista näytteistä näytteellä HUB.B 24h aikapisteestä (kuvio 16). Vasta-ainepitoisuus 1:2500 oli selkeästi parempi kuin vasta-ainepitoisuus 1:5000. Vasta-ainepitoisuudessa 1:2500 IR-näytteessä (kuvassa B) näkyy selkeitä apoptoottisia soluja (positiivista värjäntymistä), muun muassa nuolten kohdalla. Vasta-ainepitoisuudessa 1:5000 IR-näytteessä (kuvassa D) ei näy selkeää positiivista värjäntymistä, mutta taustavärjäntymistä esiintyy esimerkiksi ympyrän osittamassa kohdassa. Vasta-ainepitoisuudessa 1:2500 Mock-näytteessä (kuvassa A) näkyy epäspesifistä taustavärjäntymistä. Havaitsemisen helpottamiseksi kuvaan A on merkitty taustavärjäntymistä ympyrällä. Vasta-ainepitoisuudessa 1:5000 Mock-näytteessä (kuvassa C) ei näy epäspesifistä taustaa mutta ei myöskään positiivista värjäntymistä.



Kuvio 16. Pilkottu kaspasi-3 FIMMLab:in kuduskuljetetut näytteet 24h aikapiste

### 8.8 Pilkottu kaspasi-3 tulosten yhteenveto

Optimoinnin tuloksena pilkottu kaspasi-3 vasta-ainepitoisuuksiksi valittiin 1:2500, sekä HUSLAB:in että FIMMLab:in värjäysprosesseihin. FIMMLab:in osalta sopivat vasta-ainepitoisuudet vaihtelivat 1:1500 ja 1:2500 välillä. Kokonaisuutta tarkasteltaessa päätettiin kuitenkin valitsemaan vasta-ainepitoisuudeksi 1:2500. HUSLAB:in osalta vasta-ainepitoisuus 1:2500 oli selkeästi paras.

Optimaalisia vasta-ainepitoisuuksia valittaessa valintaan vaikutti epäspesifinen taustavärjäytyminen sekä positiivisen värjäytymisen määrä. Pienemmissä vasta-ainepitoisuuksissa oli yleensä ottaen vähemmän spesifistä värjäytymistä sekä vähemmän taustavärjäytymistä. Värjäyksessä oli tarkoitus saada hyvä spesifinen värjäystulos ilman merkittävää määrää epäspesifiä taustaa.

## 9 Tulosten tarkastelu

Optimoimamme vasta-ainepitoisuudet ( $\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspasi-3) muuttuivat FIMM:ssä alun perin käytetyistä  $\gamma$ H2AX:n 1:4000 -vasta-ainepitoisuudesta ja pilkottu kaspasi-3:n 1:500 -vasta-ainepitoisuudesta. Saadut tulokset on esitelty alla olevassa taulukossa (Taulukko 23).

Taulukko 23. Optimoidut vasta-aine pitoisuudet  $\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspasi-3 vasta-aineille.

Vasta-aine	Kudoskuljetus	Automaatti- vai manuaalivärjäys	Optimoitu vasta-ainepitoisuus
$\gamma$ H2AX	HUSLAB	Manuaali	1:10 000
$\gamma$ H2AX	HUSLAB	Automaatti	1:20 000
$\gamma$ H2AX	FIMMlab	Manuaali	1:20 000
$\gamma$ H2AX	FIMMlab	Automaatti	1:40 000
Pilkottu kaspasi-3	HUSLAB	Manuaali	1:2500
Pilkottu kaspasi-3	FIMMlab	Manuaali	1:2500

Kun verrataan  $\gamma$ H2AX HUSLAB:in manuaali- ja automaattivärjäyksen vasta-ainepitoisuuksia keskenään huomataan, että manuaalivärjäyksessä vasta-ainepitoisuus on suurempi kuin automaattivärjäyksessä. Samoin käy verrattaessa  $\gamma$ H2AX FIMMlab:in manuaali- ja automaattivärjäystä keskenään. Automaattivärjäyksessä käytettiin polymeeritekniikkaa, jossa sekundaarivasta-aineeseen oli kiinnitetty polymeeriketju. Polymeeriketjussa on enemmän sitoutumispaikkoja piparjuuriperoksidasileimalle kuin manuaalivärjäyksessä käytetyssä streptavidini-biotiini menetelmässä. Leimojen suuren määrän ansiosta kromogeenivärjäysreaktio on voimakkaampi automaattivärjäyksessä.

Verrattaessa HUSLAB:in ja FIMMlab:in  $\gamma$ H2AX tuloksia keskenään huomataan, että HUSLAB:in manuaalivärjäyksessä tarvitaan suurempi vasta-ainepitoisuus kuin FIMMlab:in manuaalivärjäyksessä. Samoin HUSLAB:in automaattivärjäyksessä tarvitaan suurempi vasta-ainepitoisuus kuin FIMMlab:in automaattivärjäyksessä. HUSLAB:in kudoskuljetus oli perinteinen menetelmä, kun taas FIMMlab:in kudoskuljetus perustui mikroaaltoihin. Mikroaaltomenetelmä näyttää voimistavan värjäytymisreaktiota.

Pilkotun kaspasi-3:n värjäyksissä päädyttiin samoihin vasta-ainepitoisuuksiin sekä HUSLAB:in että FIMMLab:in manuaalivärjäyksissä. Kudoskuljetin ei näyttänyt vaikuttavan pilkotun kaspasi-3:n tuloksiin samalla lailla kuin  $\gamma$ H2AX tuloksiin. Pilkottu kaspasi-3 -vasta-aine mittaa solukuolemaa ja se tunnistaa sytoplasmisen pilkottu kaspasi-3:n kun taas  $\gamma$ H2AX-vasta-aine mittaa pääosin DNA:n katkoksia ja tunnistaa DNA:han sitoutuneen tumaproteiinin ( $\gamma$ H2AX). Tunnistettavien kohdeproteiinien erot selittävät värjäystulosten erilaisuuden.

Ennen optimointiamme FIMM:ssä oli manuaalivärjäyksessä käytössä HUSLAB:in kudoskuljetus ja PT-moduulin tilalla mikroaaltouuni. Heillä oli silloin manuaalivärjäyksessä  $\gamma$ H2AX:n vasta-ainepitoisuus 1:4000 ja pilkottu kaspasi-3:n vasta-ainepitoisuus 1:500. Verrattaessa näitä vasta-ainepitoisuuksia optimoimiimme HUSLAB:in  $\gamma$ H2AX:n vasta-ainepitoisuuteen 1:10 000 ja pilkotun kaspasi-3:n vasta-ainepitoisuuteen 1:2500, ero on todella suuri. Tästä voidaan päätellä, että PT-moduulilla on suuri vaikutus värjäytymisintensiteettiin.

## 10 Pohdinta

Saimme optimoitua  $\gamma$ H2AX:n ja pilkottu kaspasi-3:n vasta-ainepitoisuudet manuaalivärjäyksessä HUSLAB:in ja FIMM:in kudoskuljettimille. Lisäksi optimoimme  $\gamma$ H2AX:n automaattivärjäyksen HUSLAB:in ja FIMM:in kudoskuljettimille. FIMM:ssä voidaan nyt siirtyä käyttämään uutta mikroaaltoihin perustuvaa kudoskuljetinta, jolloin värjäystulokset saadaan nopeammin. HUSLAB:ssa kudoskuljetus kesti yön yli (14 tuntia) ja FIMM:ssä vain noin 2 tuntia. Antigeenin paljastus siirtyi mikroaaltouunista uuteen laitteeseen, joka on stabiilimpi ja hellävaraisempi kudoksille. Optimoinnin johdosta voidaan  $\gamma$ H2AX:n manuaalivärjäyksen sijaan käyttää automaattivärjäystä. Manuaalivärjäyksessä laboratorioteknikko on enemmän kiinni värjäyksessä. Automaattia käytettäessä aikaa jää enemmän muihin työtehtäviin. Lisäksi värjäysten toistettavuus paranee ja inhimillisten virheiden mahdollisuus pienenee. Pilkottu kaspasi-3:n värjäyksiä ei toistaiseksi voida siirtää automaattiin, koska automaatissa ei ole mahdollisuutta inkuboida pilkottu kaspasi-3:a yön yli jääkaappilämpötilassa (+4 °C).

Kaikille  $\gamma$ H2AX-värjäysmenetelmille tuli erilainen vasta-ainepitoisuus. Molemmille pilkottu kaspasi-3 -värjäysmenetelmille tuli sama vasta-ainepitoisuus. Optimoitujen vasta-ainepitoisuuksien perusteella muokattiin jo olemassa olevia menetelmäohjeita. Tu-



loksena syntyi viisi uutta ohjetta, jotka on tarkoitettu ainoastaan FIMMLab:in käyttöön. Optimoimamme vasta-ainepitoisuudet olivat todella paljon pienemmät kuin FIMM:ssä alun perin käytetyt  $\gamma$ H2AX:n ja pilkottu kaspasasi-3:n vasta-ainepitoisuudet. Tämä johtaa siihen, että vasta-ainetta tarvitaan vähemmän. Pienemmistä vasta-ainepitoisuuksista johtuen vasta-ainekustannukset pienenevät.

Optimoinnin tuloksista huomataan, kuinka moni asia vaikuttaa värjäystuloksiin. Aina kun immunohistokemiallisiin värjäysmenetelmiin tulee muutos, pitää vasta-ainepitoisuuden oikeellisuus tarkastaa. Tulevaisuudessa värjätyt lasit tullaan taltioimaan webmikroskooppiin, josta värjäystuloksia voi tulkita automaattisten kuvankäsittelyohjelmien avulla.

### 10.1 Tulosten luotettavuus

Opinnäytetyön haasteena oli, että immunohistokemia oli aiheena uutta molemmille tekijöille. Toisella on vähän kokemusta työskentelystä tutkimusryhmässä ja toisella ei ollenkaan. Molemmilla on kuitenkin työkokemusta bioanalytikkona kesätoista HUS-LAB:ssa, toisella patologiasta ja toisella virologiasta. Työskennellessämme HUS-LAB:ssa työt etenivät tietyllä tavalla tietyssä tahdissa. Tutkimusryhmässä oli haasteena se, ettei töiden etenemistä pystynyt kokonaan ennustamaan etukäteen. Meillä ei ollut kokemusta immunohistokemiasta, joten opinnäytetyön kokeellista osuutta ei voinut suunnitella etukäteen, emmekä myöskään voineet kirjoittaa teoriaa etukäteen. Immunohistokemian teoriapohja alkoi vasta hahmottua kokeellisen osuuden aikana ja sen jälkeen.

Ennen varsinaisten värjäysten alkua meidät perehdytettiin laboratorion työtappoihin ja ennen opinnäytetyön kokeellista osuutta harjoittelimme värjäystekniikkaa ja värjäysmenetelmää harjoitusnäytteillä. Laboratorioteknikko seurasi, ohjasi, neuvoi ja korjasi virheitä harjoitusvärjäysten ajan. Opinnäytetyön immunohistokemiallisia värjäyksiä varten näytteet oli valanut ja leikannut kokenut laboratorioteknikko. Vasta-ainelaimennokset tarkistettiin ennen valmistamista, jotta välttyttäisiin laskuvirheiltä. Värjäys suoritettiin noudattamalla värjäysmenetelmän tarkkoja inkubaatioaikoja. Pipetointi tehtiin mahdollisimman tarkkaan. Pienin pipetoitava määrä oli 1  $\mu$ l, jotta virheitä ei syntyisi liian pienen tilavuuden takia. Kaikista reagensseista sekä liuoksista tarkistettiin eränumerot, tulo päivämäärät ja viimeiset käyttöpäivämäärät. Käyttöliuokset vaihdettiin tarvittaessa. Jokaisen värjäyksen teki yksi henkilö alusta loppuun. Tällä tavoin varmistimme käsityönä

tehtävien työvaiheiden yhtenäisyyden. Lisäksi kaikki värjäykset suoritettiin kahden potilaan näytelaseilla, jolla varmistettiin värjäysten toistettavuus. Tulosten luotettavuus varmistettiin käyttämällä kontrollinäytteitä. Värjäystulokset käytiin läpi opinnäytetyön ohjaajan kanssa ja hän arvioi värjäysten onnistumisen sekä mahdolliset jatkotoimenpiteet.

Käyttämämme kirjallisuus oli pääosin englanninkielistä. Lisäksi käytimme artikkeleita, joista osa oli yli kymmenen vuotta sitten julkaistuja koska haluttiin käyttää oikeaa tutkimustietoa. Tavoitteena oli käyttää lähteitä monipuolisesti ja valita kirjallisuutta eri tieteenaloilta. Pyrimme siihen, että kaikki käyttämämme lähteet (niin uudet kuin vanhemmat) tukivat toisiaan.

## 10.2 Eettisyys

Opinnäytetyössä käytetyt näytteet ovat HUB biopankin keräämiä näytteitä. HUB on saanut eettisen puollon näytekeräykseen ja tutkimukseen (Dnro, 263/13/03/2011) sekä HYKSin tutkimusluvan joulukuussa 2011 (Dnro § 212) (af Hällström 2013).

## 10.3 Ammatillinen kehittyminen

Opinnäytetyötä tehdessämme kehityimme paljon ammatillisesti. Kokeellisen osuuden immunohistokemiallisia värjäyksiä tehdessämme saimme lisää kärsivällisyyttä ja opimme tarkkuutta.  $\gamma$ H2AX-värjäykset kestivät koko työpäivän ja pilkottu kaspasi-3 -värjäykset taas puoli työpäivää kahtena peräkkäisenä päivänä. Värjäysten onnistumista ei voinut tietää etukäteen. Jokaisen värjäyskerran jälkeen katsottiin värjäystulokset ja sitten vasta tiedettiin onnistuivatko värjäykset vai eivät. Opimme tarkastelemaan värjäystuloksia ja niiden luotettavuutta. Jos värjäykset onnistivat, voitiin värjäyksiä jatkaa. Jos värjäys ei taas onnistunut, jouduttiin koko värjäys aloittamaan alusta. Tarkkuutta ja pipetointitekniikkaa opimme, kun manuaalivärjäyksessä oli paljon pipetointia ja inkubaatioajat olivat tarkkoja.

Opinnäytetyössä oli mielenkiintoista se, että se liittyi moneen alaan, kuten voi jo päätellä sanasta immunohistokemia. Vasta-aineet liittyvät immunologiaan, näytteiden valmistaminen värjäystä varten tehtiin histologisilla menetelmillä, värjäyksissä tapahtui kemiallisia reaktioita ja vasta-ainelaimennoslaskuihin tarvitsimme matematiikkaa. Lisäksi

turvauhimme solubiologiaan, biokemiaan sekä genetiikkaan tutustuessamme vasta-aineisiimme ( $\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspasi-3) ja niiden taustalla olevaan teoriaan. Oli hienoa oppia uutta eri aloista ja ymmärtää, miten ne kaikki liittyivät toisiinsa ja tukivat toisiaan.

Pääsimme tutustumaan FIMM:in moniammatilliseen yhteistyöhön, jossa työskenteli bioanalytikoita, biotekniikan insinöörejä, erikoislääkäreitä ja tutkijoita. Opimme, miten sairauksien tutkimus, diagnostiikka ja hoito yhdistyvä käytännössä. Saimme kehittää englannin kielen taitoamme, sillä FIMM:ssä on opiskelijoita ja työntekijöitä monesta eri maasta. Saimme kuunnella esityksiä meneillään olevista erilaisista tutkimusprojekteista englanniksi sekä suomeksi. Lisäksi suurin osa teoriasta opinnäytetyöhömme löytyi englanninkielisistä artikkeleista ja kirjallisuudesta.

#### 10.4 Jatkotutkimukset

$\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspasi-3 -vasta-aineet on optimoitu kromogeenisille värjäysmetodeille ja nyt ne voidaan yhdistää immunofluoresenssimenetelmällä. Immunofluoresenssimenetelmällä toinen vasta-aine voidaan leimata esimerkiksi punaisella ja toinen vihreällä fluoresoivalla leimalla, jolloin molempia vasta-ainevärjäytymiä voidaan katsoa yhtä aikaa samalta lasilta fluoresenssimikroskoopilla. Tämän lisäksi voidaan leimata vielä kaksi muuta vasta-ainetta, jolloin yhteensä neljää vasta-ainevärjäytymistä voidaan katsoa yhtä aikaa samalta lasilta fluoresenssimikroskoopilla.

$\gamma$ H2AX ja pilkottu kaspasi-3 -vasta-aineiden lisäksi muillekin tutkimuksissa käytettäville vasta-aineille pitää optimoida vasta-ainepitoisuus. Kun optimoinnit on suoritettu, voidaan verrata solukuolemaa syöpä- ja normaalisolukon välillä lääkeainekäsitellyissä kudoksenäytteissä.

FIMM:ssä yhtenä tutkimuksen osa-alueena on yksilöity syöpäterapia. Optimoituja vasta-ainemenetelmiä tullaan käyttämään mitattaessa tiettyjen lääkeaineiden aiheuttamaa solukuoleman määrää kunkin potilaan omassa tuorekudoksessa. Tietoa lääkeainekohtaisesta solukuoleman määrästä voitaneen tulevaisuudessa käyttää yksilöidyssä lääkehoidossa.

## Lähteet

Alberts, Bruce – Johnson, Alexander – Lewis, Julian – Raff, Martin – Roberts, Keith – Walter, Peter 2008. *Molecular Biology of the Cell*. 5<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science.

Ausió, Juan – Abbott, D. Wade 2002. The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 41 (19): 5945-5949. Verkkodokumentti. <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi020059d>>. Luettu 12.8.2013.

Babu, T. Mahesh – Malathi, N. – Magesh, KT 2011. A Comparative Study on Microwave and Routine Tissue Processing. *Indian Journal of Dental Research* 22 (1). 50–55. Verkkodokumentti. <<http://www.ijdr.in/article.asp?issn=0970-9290;year=2011;volume=22;issue=1;spage=50;epage=55;aulast=Babu>>. Luettu 12.8.2013.

Boenisch, Thomas 2009. *Basic Enzymology*. Teoksessa Kumar, George L. – Rudbeck, Lars (toim.): *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods*. 5<sup>th</sup> ed. Carpinteria: Dako North America. 15–20. <[http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf)>. Luettu 15.5.2013.

BrightVision + 2013. Poly- HRP-Anti Ms/Rb/Rt IgG, Biotin-free, Ready-to-use. Immunologic. Version: 02.1.

Brown, Terry 2012. *Introduction to Genetics -a Molecular Approach*. New York: Garland Science.

Carson, Freida L. – Hladik, Christa 2009. *Histotechnology a self-instructional text*. 3<sup>rd</sup> ed. Chicago: American Society for Clinical Pathology Press.

Cleaved Caspase-3 2011. *Cell Signaling Technology*. Vasta-aineen käyttötiedote. Luettavissa myös sähköisesti. <<https://www.cellsignal.com/pdf/9664.pdf>>.

DAB-manuaalivärjäys 2009. Dako. Liquid DAB+ Substrate Chromogen System. Reagenssikitin käyttöohje. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://www.dako.com/download.pdf?objectid=106793006>>.

DAB-automaattivärjäys 2013. Immunologic. Bright-DAB. Reagenssikitin käyttöohje. Luettavissa myös sähköisesti. <<http://www.immunologic.nl/afbeeldingen/bestanden/BS04%20%20Bright%20DAB%20version%202.2.pdf>>.

Delves, Peter J. – Seamus, Martin J. – Burton, Dennis R. – Roitt Ivan M. 2012. *Roitt's Essential Immunology*. 12<sup>th</sup> ed. Chichester: Wiley-Blackwell.

Eturauhassyöpä 2012. Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim. Verkkodokumentti. <[http://www.duodecimlehti.fi.ezproxy.metropolia.fi/web/guest/etusivu?p\\_p\\_id=dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku&p\\_p\\_action=1&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_\\_spage=%2Fportlet\\_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_\\_tunnus=duo10002&dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_p\\_frompage=haku&dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_hakusana=eturauhanen](http://www.duodecimlehti.fi.ezproxy.metropolia.fi/web/guest/etusivu?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__tunnus=duo10002&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_frompage=haku&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_hakusana=eturauhanen)>. Luettu 4.5.2013.

Eturauhassyöpä 2007. Käypä hoito. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Urologiyhdistys ry:n asettama työryhmä. Verkkodokumentti. <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/tunnus/hoi11060>>. Luettu 4.5.2013.

Hartman, Boyd K 1973. Immunofluoresence of Dopamine - $\beta$ - Hydroxylase Application of Improved Methodology to the localization of the Peripheral and Central Noradrenergic Nervous System. *J Histochem Cytochem* 21 (4). 312–332. Verkkodokumentti. <<http://jhc.sagepub.com/content/21/4/312.long>>. Luettu 12.8.2013.

Hirata, Hirokazu –Takahashi, Atsushi – Kobayashi, Susumu – Yonehara, Shin – Sawai, Hirofumi – Okazaki, Toshiro –Yamamoto, Kokichi – Sasada, Masataka 1998. Caspases Are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-induced Apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 187 (4). 587–600. Verkkodokumentti. <<http://jem.rupress.org/content/187/4/587.full.pdf+html>>. Luettu 9.9.2013.

Huang, Xuan – Okafuji, Masaki – Traganos, Frank – Luther, Ed – Holden, Elena – Darzynkiewicz, Zbigniew 2004. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry Part A* 58A (2) 99–110. Verkkodokumentti. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.a.20018/pdf>>. Luettu 12.8.2013.

af Hällström, Taija 2013. Vanhempi tutkija. FIMM. Helsinki. Suullinen tiedonanto 16.9.2013.

Jackson Peter 2007. Quality Assurance in Immunocytochemistry. Teoksessa Renshaw Simon. *Immunohistochemistry-methods express*. Trowbridge: Scion Publishing. 205–237.

Jackson, Peter – Blythe, David 2013. Immunohistochemical techniques. Teoksessa Suvana, S. Kim. – Layton, Christopher – Bancroft, John D. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier. 381–426.

Jäämaa, Sari – af Hällström Taija M – Sankila, Anna – Rantanen, Ville – Koistinen, Hannu – Stenman, Ulf-Håkan – Zhang, Zhewei – Yang, Zhiming – De Marzo, Angelo M – Taari, Kimmo – Ruutu, Mirja – Andersson, Leif C – Laiho, Marikki 2010. DNA Damage Recognition via Activated ATM and p53 Pathway in Nonproliferating Human Prostate Tissue. *Cancer Research* 70(21). 8630-8641. Verkkodokumentti. <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/21/8630.full.pdf+html>>. Luettu 12.8.2013.

Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Joensuu, Timo – Tammela, Teuvo 2013. Etu-  
rauhassyöpä. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen,  
Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Lyly, Teppo (toim.). Syöpätaudit. Helsin-  
ki: Kustannus Oy Duodecim. 562–580.

Kenny-Moynihan, Mary B. – Unger, Elizabeth R 2003. Immunohistochemical and In  
Situ Hybridization Techniques. Teoksessa O’Leary, Timothy J: Advanced Diagnostic  
Methods in Pathology – Principles, Practice and Protocols. Edinburgh: W.B. Saunders.  
95- 122.

Key, Marc 2009. Immunohistochemistry Staining Methods. Teoksessa Kumar, George  
L. – Rudbeck, Lars (toim.): Education Guide Immunohistochemical Staining Methods.  
5<sup>th</sup> ed. Carpinteria: Dako North America. 57–60. Verkkodokumentti.  
< [http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf)>. Luettu 15.5.2013.

Kierszenbaum, Abraham L. – Tres, Laura L 2012. Histology and cell biology: an intro-  
duction to pathology. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Saunders.

Kindt, Thomas J. – Goldsby, Richard A. – Osborne, Barbara A. 2007. Kuby Immunolo-  
gy. 6<sup>th</sup> ed. New York: W.H. Freeman.

Kobayashi, Junya 2004. Molecular Mechanism of the Recruitment of  
NBS1/hMRE11/hRAD50 Complex to DNA Double-strand Breaks: NBS1 Binds to  $\gamma$ -  
H2AX through FHA/BRCT Domain. Journal of Radiation Research 45 (4). 473–478.  
Verkkodokumentti.  
<[http://jrr.oxfordjournals.org/content/45/4/473.full.pdf+html?sid=a45803ec-ce28-4a9f-  
becc-7ea27721a7c9](http://jrr.oxfordjournals.org/content/45/4/473.full.pdf+html?sid=a45803ec-ce28-4a9f-becc-7ea27721a7c9)>.  
Luettu 12.8.2013.

KOS Rapid Microwave Labstation 2012. Operator Manual MM073-004 (June 2012).  
Milestone.

Kudoskuljetus 2013. HUSLAB Meilahden patologian laboratorio Meipa1. Helsingin ja  
Uudenmaan sairaanhoitopiiri.

Kumar, George L. – Rudbeck, Lars 2009. Demasking of Antigens. Teoksessa Kumar,  
George L. – Rudbeck, Lars (toim.): Education Guide Immunohistochemical Staining  
Methods. 5<sup>th</sup> ed. Carpinteria: Dako North America. 51–56. Verkkodokumentti.  
< [http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf)>. Luettu 15.5.2013.

Kujala, Paula 2012. Miehen sukuelimet. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli –  
Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.). Pa-  
tologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 799–817.

Kujala, Paula 2012. Soluvaurio ja nekroosi. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli  
– Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.).  
Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 115–154.

Lee, Ji-Hoon – Paull, Tanya T. 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks  
through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Science 308 (5721). 551–554. Verkkodoku-  
mentti. <<http://www.sciencemag.org/content/308/5721/551.full.pdf>>.  
Luettu 12.8.2013.

Lehto, Veli-Pekka – Stenbäck, Frej 2012. Geneettiset ja ympäristötekijät tautien synnyssä. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.). Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 13–102.

Lukkarinen, Olavi – Kunnamo, Ilkka – Aho, Tellervo 2004. Eturauhassyöpä – Käyvän hoidon potilasversiot. Verkkodokumentti. Päivitetty 2013. <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/naytaartikkeli/tunnus/khp00006>>. Luettu 13.5.2013.

Mescher, Anthony L 2013. Junqueira's basic histology: text and atlas. 13<sup>th</sup> ed. New York : McGraw-Hill Medical.

Mirtti, Tuomas – Rannikko, Antti 2012. Eturauhassyövän yksilöllinen hoitovalinta - apuna molekyylipatologiset merkkiaineet ja biopankki. Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim. Verkkodokumentti.

<[http://www.duodecimlehti.fi.ezproxy.metropolia.fi/web/guest/etusivu?p\\_p\\_id=dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku&p\\_p\\_action=1&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&\\_dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_\\_spage=%2Fportlet\\_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&\\_dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_tunnus=duo10676&\\_dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_p\\_frompage=haku&\\_dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_hakusana=eturauhanen](http://www.duodecimlehti.fi.ezproxy.metropolia.fi/web/guest/etusivu?p_p_id=dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku__spage=%2Fportlet_action%2Fdlehtihakuartikkeli%2Fviewarticle%2Faction&_dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_tunnus=duo10676&_dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_frompage=haku&_dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_hakusana=eturauhanen)>. Luettu 4.5.2013.

Murphy, Kenneth 2012. Janeway's immunobiology. 8<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science.

Mäkinen, Markus 2012. Diagnostiset menetelmät. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.). Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 1121–1194.

Nukkarinen, Anita 2010. Immunohistokemian kontrollikirjasto. Moodi 1. 82-83.

Pace, Gale. E. 2009. Optimization of Immunohistochemical Reactions. Teoksessa Kumar, George L. – Rudbeck, Lars (toim.): Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. 5<sup>th</sup> ed. Carpinteria: Dako North America. 108–114. Verkkodokumentti. <[http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf)>. Luettu 15.5.2013.

Rantala, Immo – Laasonen, Antero 2000. Immunohistokemialliset värjäykset. Moodi 24 (4-5). 148-152.

Potilaan tiedote 2012. Helsingin urologinen biopankki (HUB): urologisten syöpien diagnostiikan ja hoidon alueellinen kehittämishanke. Versio 3.0. 24.10.2012. Verkkodokumentti. <[http://www.hubbiobank.fi/midcom-serveattachmentguid-1e27f85d5308c3e7f8511e29eb4214f810773ba73ba/potilaan\\_tiedote\\_ja\\_suostumus\\_221012\\_v3.pdf](http://www.hubbiobank.fi/midcom-serveattachmentguid-1e27f85d5308c3e7f8511e29eb4214f810773ba73ba/potilaan_tiedote_ja_suostumus_221012_v3.pdf)>. Luettu 3.9.2013.

Renshaw, Simon 2007. Immunohistochemical Staining Techniques. Teoksessa Renshaw Simon. Immunohistochemistry-methods express. Trowbridge: Scion Publishing. 45–96.

Rhodes, Anthony 2013. Fixation of tissues. Teoksessa Suvarna, S. Kim. – Layton, Christopher – Bancroft, John D. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier. 69–93.

Rittenhouse-Olson, Kate – De Nardin, Ernesto 2013. Contemporary Clinical Immunology and Serology. Boston: Pearson.

Rogakou, Emmy P. – Boon, Chye – Redon, Christophe – Bonner, William M. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *Journal of cell biology*. 146 (5). 905–916. Verkkodokumentti. <<http://jcb.rupress.org/content/146/5/905.full.pdf+html>>. Luettu 12.8.2013.

Rogakou, Emmy P. – Pilch, Duane R. – Orr, Ann H.– Ivanova, Vessela S. – Bonner, William M. 1998: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10). 5858-5868. Verkkodokumentti. <<http://www.jbc.org/content/273/10/5858.full.pdf+html>>. Luettu 12.8.2013.

Ross, Michael H. – Pawlina, Wojciech 2011. *Histology a Text and Atlas*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.

Rubin, Raphael – Strayer, David S 2012. *Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Sanderson, Tracy – Zardin, Gregory 2013. *Immunohistochemistry Quality Control*. Teoksessa Suvarna, S. Kim. – Layton, Christopher – Bancroft, John D. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7<sup>th</sup> ed Oxford: Churchill Livingstone Elsevier. 435–454.

Spencer, Lena T. – Bancroft, John D. 2013. *Tissue Processing*. Teoksessa Suvarna, S. Kim. – Layton, Christopher – Bancroft, John D. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Churchill Livingstone Elsevier. 105-123.

Stevens Alan – Lowe James 2005. *Human histology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Mosby.

Tammela, Teuvo 2013. *Eturauhassyöpä. Lääkäriin käsikirja. Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim*. Verkkodokumentti. <[http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/ltk/koti?p\\_artikkeli=ykt00294&p\\_haku=eturauhassy%C3%B6p%C3%A4](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00294&p_haku=eturauhassy%C3%B6p%C3%A4)>. Luettu 27.9.2013.

Taylor, Clive R. – Shi, Shan-Rong – Barr, Nancy J. – Wu, Nancy 2006. *Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization*. Teoksessa Dabbs David J. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier. 1–42.

Tirri, Rauno – Lehtonen, Juhani – Lemmetyinen, Risto – Pihakaski, Seppo – Portin, Petter 2006. *Biologian sanakirja*. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Otava.

Tissue-Clear Sakura 2013. *Tissue-Tek® Tissue-Clear® Xylene Substitute*. Verkkodokumentti. <<http://www.sakura.eu/products/showitem.asp?cat=6&subcat=16>>. Luettu 27.8.2013.

Tomita, Tatsuo 2010. *Immunocytochemical Localization of Cleaved Caspase-3 in Pancreatic Islets from Type I Diabetic Subjects*. *Islets* 2 (1). 24-29. Verkkodokumentti. <<https://www.landesbioscience.com/journals/islets/TomitaISLETS2-1.pdf>>. Luettu 9.9.2013.

Voet, Donald J. – Voet, Judith G. – Pratt, Charlotte W. 2008. *Principles of Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Hoboken: Wiley-Blackwell.



Wendelboe, Helle Grann – Bisgaard, Kirsten 2009. Background. Teoksessa Kumar, George L. – Rudbeck, Lars (toim.): Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. 5<sup>th</sup> ed. Carpinteria: Dako North America. 115–122. Verkkodokumentti. < [http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf)>. Luettu 15.5.2013.

Wood, Jamie L. – Chen, Junjie 2006. DNA Damage Sensing and Signaling. Teoksessa Wei, Qingyi – Li, Lei – Chen, David J. DNA Repair, Genetic Instability and Cancer. Hackensack: World Scientific. 1–22.

Young Barbara – Stewart William – O'Dowd Geraldine 2011. Wheater's basic pathology: a text, atlas, and review of histopathology. 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier.