

**Ki-67-PROLIFERAATIOINDEKSIN
MÄÄRITYS AIVOKASVAIMISSA**

Toomas Haapasalo
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Aivokasvainryhmä
Tammikuu 2013

TIIVISTELMÄ

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Aivokasvainryhmä

HAAPASALO TOOMAS: Ki-67-PROLIFERAATIOINDEKSIN MÄÄRITYS
AIVOKASVAIMISSA

Kirjallinen työ, 32 s.
Ohjaaja: dosentti Hannu Haapasalo

Tammikuu 2013

Avainsanat: soluproliferaatio, MIB-1, immunohistokemia, kuva-analyysi

Aivokasvainten pahanlaatuisuuden luokittelussa arvioidaan kasvainten histologiaa ja molekyylipatologisia, ennen kaikkea immunohistokemiallisia määrittämiä, mm. solusyklin eri vaiheiden analyysiä (esimerkiksi MIB-1/Ki-67-indeksi). Ki-67-vasta-aine reagoi jakautuvien solujen tumien kanssa. MIB-1-vasta-ainevärjäyksellä Ki-67-antigeenia voidaan osoittaa patologian laboratorioissa yleisesti käytetyissä formaliinifiksoiduissa ja paraffiiniin valetuissa kudoksissa. Tutkimuksen tarkoituksena on tutkia MIB-1-proliferaatioindeksin määrittämiä ja merkitystä aivokasvainten histologisessa luokittelussa. Tutkimusmateriaali perustuu Interphone-tutkimukseen, jota varten kerättiin vuosina 2000–2002 kaikista Suomen yliopistosairaaloista aivokasvainpotilaita. Näiden potilaiden histologiset näytteet kerättiin Pirkanmaan sairaanhoitopiirin Laboratoriokeskuksen patologian laboratorioon. Tutkimusta varten MIB-1-proliferaatioindeksi määritettiin automaattisesti erilaisilla kuva-analysaattoreilla (CAS-200 ja ImmunoRatio). Värjäykset tehtiin kolmella erilaisella värjäysautomaatilla (Techmate, Bond Max ja Lab Vision). Proliferaatioindeksit määritettiin 729 potilaan näytteistä. Matalimmat MIB-1-indeksit todettiin gradus 1 tuumoreilla (pilosyyttisillä astrozytoomilla, schwannoomilla ja meningeoomilla). Vastaavasti korkeimmat proliferaatioindeksit todettiin glioblastoomilla (astrozytooma gradus 4) ja lymfoomilla. Tutkimuksessa osoitettiin MIB-1-indeksien voimakas korrelaatio histologiseen gradukseen sekä glioomissa että meningeoomissa (molemmissa $p < 0,001$, Kruskal-Wallis ja Mann-Whitney U -testit). Toistettavuustutkimuksissa käytettiin monikudosblokkia, josta onnistuneesti kyettiin analysoimaan 121 aivokasvainta. Kaikkien käytettyjen neljän MIB-1-määrittämissämenetelmän välille saatiin hyvä toistettavuus (korrelaatiokertoimet 0,903–0,956). Yleisesti ottaen Bond Max -automaatti antoi korkeampia arvoja kuin muut menetelmät. Värjäysautomaateista Techmaten ja Lab Visionin antamat MIB-1-indeksit korreloivat parhaiten keskenään. Tutkimuksen yleisesti antamiin muuta kirjallisuutta hiukan korkeampiin proliferaatioindekseihin voivat vaikuttaa tässä tutkimuksessa käytettyjen tarkkojen mittausmenetelmien ohella myös muut laboratoriotekniikkaan liittyvät syyt. Tämän tutkimuksen antamien tulosten perusteella voidaan todeta proliferaatiomittauksen olevan keskeinen osa aivokasvainten histologista arviointia. Proliferaatioprosenttien vaihtelevuus tämän ja muiden tutkimusten välillä tarkoittaa sitä, että jokaisen laboratorion täytyy määrittää omat viitearvonsa proliferaatiomittauksiin.

SISÄLLYS

1. Johdanto	4
1.1 Yleistä aivokasvaimista	4
1.2 Solusykli	5
1.3 Solusyklin mittarit	5
1.4 Tutkimuksen tavoitteet	7
2. Materiaali ja menetelmät	8
2.1 Materiaali	8
2.1. Interphone-tutkimus	8
2.2 Menetelmät	9
2.2.1 MIB-1-värjäykset	9
2.2.2 CAS-200-kuva-analyysilaite	10
2.2.3 ImmunoRatio-ohjelmaan perustuva kuva-analyysi	11
2.2.4 Tilastolliset menetelmät	12
2.2.5 Eettiset näkökohdat	12
3. Tulokset	13
3.1 MIB-1-proliferaatioindeksi aivokasvainten histologisessa luokituksessa	13
3.2 Värjäysmenetelmien ja kuva-analyysin toistettavuus	15
4. Pohdinta	27
4.1 Eri kasvainten proliferaatioindeksit	27
4.2 Immunohistokemialliseen värjäytymiseen vaikuttavat yleiset tekijät	28
4.3 MIB-1-värjäysmenetelmien ja kuva-analyysin toistettavuus	28
4.4 Muut MIB-1-proliferaatioindeksien vaihtelun syyt	29
4.5 Lopuksi	30
Lähteet	31

1 JOHDANTO

1.1 Yleistä aivokasvaimista

Uusia hermostoperäisiä kasvaimia todetaan Suomessa vuosittain noin 850 potilaalla ja aivokasvaimet ovat niistä tavallisimpia. Lapsilla hermostokasvaimet ovat toiseksi yleisin kasvaintyyppi, aikuisilla ne ovat naisilla seitsemänneksi ja miehillä kymmenenneksi yleisimpiä syöpiä. (1) Aivokasvainpotilaan ennusteeseen vaikuttavat ennen kaikkea potilaan ikä, kasvaimen sijainti ja hoitovaste sekä sen histologinen tyyppi ja gradus.

Aivokasvain on aiemmin pyritty histologisesti nimeämään solutyypin mukaan, josta sen arvellaan olevan lähtöisin. Edustavan näytteen histologinen tutkimus on luokittelussa tärkeintä, useimmiten täydennettynä immunohistokemiallisin värjäyksin. Nykyisin lisäksi kasvaimeen liittyvät molekyylogeneettiset ominaisuudet ohjaavat entistä enemmän diagnostiikkaa ja hoitoa. Keskushermoston kasvainten luokituksessa luetellaan noin 120 kasvaintyyppiä (2). Tarkka kasvaintyyppin tunnistaminen on tärkeää, ja tässä siis histologia, immunohistokemia ja molekyylipatologia yhdistettynä kliinisiin ja neuroradiologisiin tietoihin on keskeistä. Tässä tutkimuksessa käsitellään laajan kasvainsarjan joukosta tarkemmin tavallisimpia kasvaimia, aivojen tukisoluista syntyviä glioomia ja aivokalvoista alkunsa saavia meningeoomia.

Aivokasvainten pahanlaatuisuuden luokittelussa (gradus) arvioidaan kasvaimen histologiaa: solukkuutta, tuma-atypiaa, mitosiaktiiviteettia, verisuonten uudismuodostusta, nekroosia ja invaasiotaipumusta ympäristön normaaleihin rakenteisiin. Toisaalta tarkan kasvaintyyppin tunnistaminen on keskeistä gradeerauksessa. Hyvänlaatuiset, hitaasti kasvavat kasvaimet sijoittuvat gradus 1:een ja ovat yleensä parannettavissa kirurgisesti radikaalilla hoidolla. Gradusten 2–4 kasvaimet uusivat usein hoidosta huolimatta infiltroivan kasvutapansa vuoksi. Useilla gradus 2:n kasvaimilla on taipumus pahanlaatuistumiseen. Gradus 3:n kasvaimet ovat selvästi pahanlaatuisia ja mitoottisesti aktiivisia, gradus 4:n kasvaimet puolestaan erittäin nopeakasvuisia ja kaikkein pahanlaatuisimpia tuumoreita. Pahanlaatuisuusasteen

määrittämisessä käytetään apuneuvona tavallisesta kudosleikkeestä arvioitavien tekijöiden ohella molekyylipatologiaa, ennen kaikkea immunohistokemiallisia määrityksiä, mm. solusyklin eri vaiheiden analyysiä (esimerkiksi MIB-1/Ki-67-indeksi).

1.2 Solusykli

Solusykli on solun peräkkäisten jakautumisten välinen jakso, jota sekä normaalit että kasvainsolut käyvät läpi. Varsinaisen solunjakautumisen eli mitoosin lisäksi solusykliin kuuluu DNA-synteesi eli S-vaihe, jossa DNA ja kromosomit kahdentuvat. Lisäksi solusykliin kuuluvat välivaiheet G1 ja G2, joista G1 edeltää S-vaihetta ja G2 edeltää M-vaihetta eli mitoosia. Varhaisesta G1-vaiheesta solu voi edetä G0- eli lepovaiheeseen. Solusykliä säätelevät lukuisat eri proteiinit, esimerkiksi sykliiniproteiinit, jotka puolestaan aktivoivat sykliineistä riippuvaisia kinaaseja sitoutumalla niihin. Sykliinit ilmenevät soluissa vain tiettyjen solusyklin vaiheiden aikana.

Solusyklin voidaan ajatella muodostuvan välivaiheesta eli interfaasista ja solunjakautumisesta eli mitoosista. Interfaasin aikana solu valmistautuu mitoosiin kasvamalla kokoa sekä monistamalla DNA:nsa ja soluorganellinsa. Interfaasiin kuuluvat vaiheet G1, S ja G2. Näistä vaihteista G1 on tavallisesti pisin.

Kasvainsolujen proliferaatiomittauksen arvo kasvainten aggressiivisuuden arvioinnissa perustuu kahteen syöpäsolujen proliferaation seurannaiseen: tuumorin kasvuun ja metastasointikykyyn. Kasvainten soluproliferaation arviontiin on sovellettu useita eri menetelmiä. Näistä vanhin, 1900-luvun alusta alkaen käytetty, on mitoosilaskenta, jossa arvioidaan kasvainsolujen mitoosiaktiiviteettia histologisessa tutkimuksessa normaalisti käytetyistä kudosleikkeistä. Patologit käyttävät mitoosilaskentaa diagnostiikassa arvioidessaan kasvaimen laatua. Karkeata mitoosiarviointia käytetään myös syövän erilaistumisasteen arvioinnissa.

1.3 Solusyklin mittarit

Kasvaimien proliferaatioaktiiviteettia määritetään myös moderneilla menetelmillä. 1980-luvulla käyttöön otetussa DNA-virtaussytometriassa tuumorisolukko hajotetaan

suspensiomuotoon ja merkitään DNA:han sitoutuvalla fluoresoivalla merkkiaineella. Peräkkäisistä soluista koostuva suspensiosuihku suunnataan lasersäteen läpi ja suihkusta siroavaa valoa rekisteröidään detektoreilla. Valonsironta ja fluoresenssi-impulssit muunnetaan ja ohjataan tietokoneeseen. Tietokoneelta voidaan tulostaa histogrammi, joka esittää solujen DNA-määrän. Histogrammista voidaan laskennallisesti määrittää DNA:ta syntetisoivien eli S-vaiheen solujen osuus.

1980-luvun lopusta lähtien tutkijoiden kiinnostus on kohdistunut solusyklin merkkiproteiineihin eli proliferaatioantigeeneihin. Ne ovat solusyklin eri vaiheissa spesifisti esiintyviä antigeeneja, jotka yleensä esiintyvät tumassa tai tumajyväsessä. Niitä voidaan syöpäkudoksen kudosteikkaisissa osoittaa immunohistokemiallisesti erilaisilla vasta-aineilla. Tärkeimpiä näistä merkkiproteiineista ovat Ki-67- ja PCNA-proteiini (proliferating cell nuclear antigen) (3).

PCNA ekspressoituu etenkin solusyklin S-vaiheessa, mutta myös molemmissa välivaiheissa S-vaiheen molemmin puolin. Vaikka PCNA-indeksi (PCNA-positiivisten tumien prosentuaalinen osuus kaikista tumista) on osoitettu liittyvän vahvasti useiden eri kasvainten pahanlaatuisuusasteeseen ja ennusteeseen, immunohistokemian luotettavuudesta proliferaatiomittauksissa on ollut paljon keskustelua (4). PCNA-proteiinin osoitus ei ole enää nykyisin käytössä proliferaatiomittauksissa.

1980-luvun alussa kuvattiin monoklonaalinen Ki-67-vasta-aine, joka reagoi jakautuvien solujen tumien kanssa (5). Ki-67-geeni on paikannettu kromosomiin 10 (10q25). Sen proteiinituote on välttämätön osatekijä DNA-synteesissä. Ki-67-antigeeniekspressio alkaa S-vaiheen alussa ja lisääntyy koko S- ja G2-vaiheiden läpi saavuttaen huippupitoisuuden mitoosissa. Solujakautumisen jälkeen G1-vaiheen tumissa voidaan havaita pieni määrä antigeenia, joka lopulta häviää. Ki-67-proteiinia ei siis tavata G0-vaiheessa. Ki-67:n rooli solun jakautumisessa on vielä epäselvä. Tiedetään kuitenkin, että se fosforyloituu seriini- ja treoniini-aminohapoista ja se on tärkeä proteiini solun jakautumisen kannalta.

Aluksi Ki-67-proteiinia kyettiin immunohistokemiallisesti osoittamaan vain tuorekudosnäytteestä. MIB-1-vasta-ainevärjäyksellä Ki-67 voidaan osoittaa myös formaliinifiksoidussa ja paraffiiniin valetussa kudoksessa mikroaaltouunikäsittelyn jälkeen (6). MIB-1-vasta-ainevärjäyksestä on sittemmin tullut kliinisissä patologian

laboratorioissa yleisimmin käytetty molekyylipatologinen proliferaation mittaamenetelmä, jota on tutkittu paljon myös aivokasvaimissa ja jonka on osoitettu liittyvän niiden ennusteeseen (3, 7).

Soluproliferaation mittarina on käytetty myös tumajyväsien organisaatioalueita (AgNOR) (8). Ne ovat DNA-lenkkejä, joissa RNA-transkriptio tapahtuu ja joissa on ribosomaalisen RNA:n geenejä ja niihin liittyviä proteiineja. AgNOR-alueiden määrän on havaittu korreloivan muihin solusyklimittareihin ja näin on päätelty niiden liittyvän soluproliferaatioon. Menetelmän arvoa häiritsee positiivisten alueiden kvantitoinnin vaikeus. Lisäksi näiden nukleiinihappoproteiinikompleksien funktio on huonosti ymmärretty. Myös histoni-mRNA-in-situ-hybridisaatiota ja histoni-immunohistokemiaa (PHH3) on käytetty proliferaatiomittauksessa (9, 10).

1.4 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tarkoituksena on tutkia MIB-1-proliferaatioindeksin määrittämistä ja merkitystä aivokasvainten histologisessa luokittelussa. MIB-1-proliferaatioindeksi määritetään automaattisesti erilaisilla kuva-analysaattoreilla. Värjäykset on tehty erilaisilla värjäysautomaateilla, ja myös värjäyksessä käytetty jakautumattomien solujen eli MIB-1-negatiivisten solujen tumaväri vaihtelee. Standardina toimii jo 1990-luvulla Tampereella kehitetty MIB-mittausmenetelmä (3). Tutkimuksen tavoitteena on 1) tutkia MIB-1-proliferaatioindeksin merkitystä aivokasvainten histologisessa luokittelussa, 2) testata eri värjäysmenetelmien ja kuva-analyysimenetelmien toistettavuutta aiempaan kuva-analyysimenetelmään ja värjäystekniikkaan nähden.

2 MATERIAALI JA MENETELMÄT

2.1 Materiaali

2.1. Interphone-tutkimus

Interphone-tutkimuksessa selvitetään aivokasvainten mahdollisia etiologisia tekijöitä, mm. matkapuhelimen käytölle altistumista. Kyseessä on tapaus-verrokkitutkimus, jota varten kerättiin marraskuun 2000 ja syyskuun 2002 välisenä aikana kaikista Suomen yliopistosairaaloista aivokasvainpotilaita ja heille iän ja sukupuolen mukaan vakioituja verrokkeja. Tutkimukseen kuului koko Suomi pois lukien Ahvenanmaa ja pohjoisin Lappi.

Potilaat olivat iältään 20–69-vuotiaita. Heillä ei ollut aikaisempia aivokasvaimia. Potilaista 87 % antoi luvan tutkimukselle ja heitä haastateltiin kiinnittäen huomiota mahdollisiin aivokasvaimille altistaviin tekijöihin, esimerkiksi matkapuhelimen käyttöön, ammattiin liittyvään altistumiseen (säteily), perinnöllisyyteen, hormonihoitoihin ja radiologisiin tutkimuksiin.

Tutkimukselle luvan antaneiden potilaiden aivokasvainten histologiset näytteet kerättiin Pirkanmaan sairaanhoitopiirin Laboratoriokeskuksen patologian laboratorioon (739 näytettä). Kaikki näytteet luokiteltiin WHO:n aivokasvainluokituksen (2007) mukaisesti kahden neuropatologin toimesta. Aivokasvainnäyteblokeista otettiin edustavalta alueelta erityisellä monikudosblokkilaitteella (Beecher Instruments, USA) kudoslieriöt monikudosblokkeihin, jotka sisältävät yhteensä 100–150 eri aivokasvainta. Yhteensä 729 tuumorista riitti näytemateriaalia kuuteen monikudosblokkiin. Yksi monikudosblokki, joka sisälsi 124 näytettä, otettiin mukaan proliferaatiomittauksen toistettavuutta selvittäviin jatkotutkimuksiin.

2.2 Menetelmät

2.2.1 MIB-1-värjäykset

MIB-1-värjäyksistä kolme (menetelmät A, B ja C) suoritettiin Pirkanmaan sairaanhoitopiirin Laboratoriokeskuksen patologian laboratoriossa. Menetelmä D:ssä värjäys suoritettiin Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutin syöpäbiologian laboratoriossa. Kaikissa värjäyksissä (taulukko 2) formalinifiksoiduista ja paraffiiniin pedatuista kudosplokeista leikattiin noin 5 mikrometrin paksuiset leikkeet.

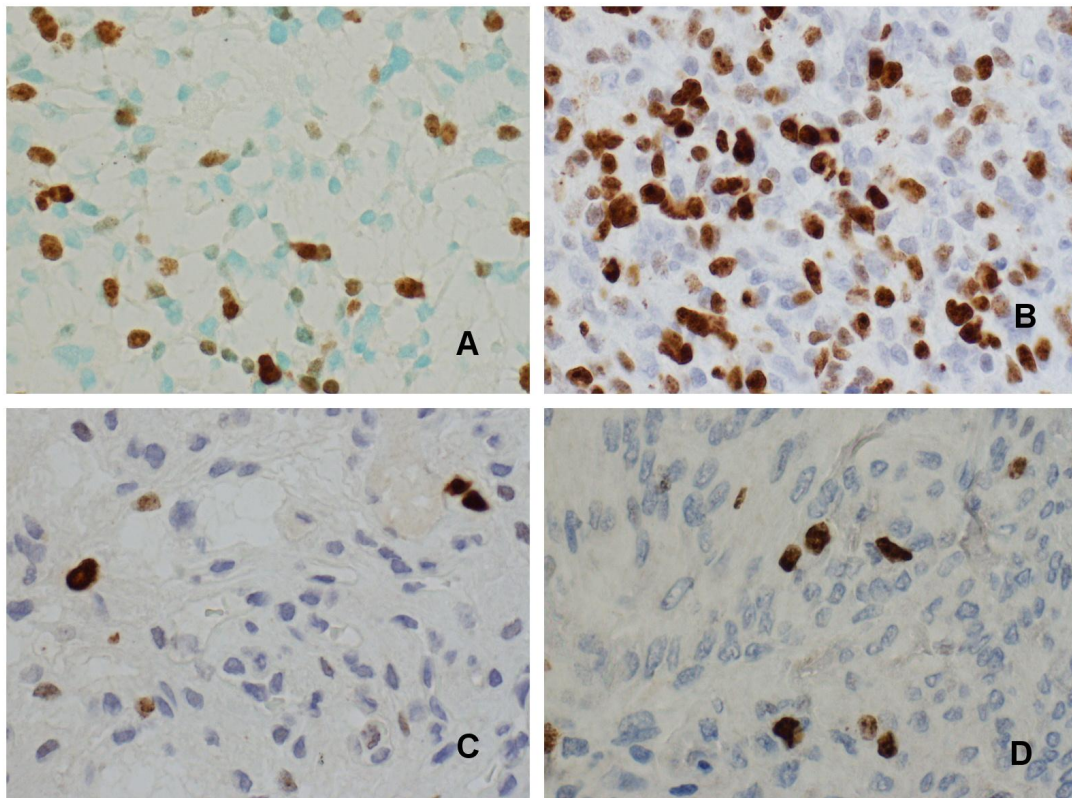
Menetelmässä A leikkeitä kiinnitettiin 56 °C:ssa lämpölevyllä yhden tunnin ajan, jonka jälkeen ne deparaffinoitiin xyleenillä, rehydroitiin alkoholisarjassa ja esikäsiteltiin Tris-EDTA-puskurissa (pH 9,0) mikroaaltouunissa (850 W, 2 x 7 min). Leikkeet värjättiin Techmate TM 500 Plus -automaatilla (Dako, Denmark) ENVP-ohjelmalla. Primaarivasta-aineena käytettiin MIB-1:tä (Dako, Denmark) laimennoksena 1:110 ja positiivinen värjäytyminen osoitettiin detektiokitillä. Tumavärinä käytettiin CAS-200-kuva-analyysiä varten 0,03-prosenttista metyyliivihreää (kuva 1A).

Menetelmä B oli muuten edellä kuvatunlainen, mutta positiivinen värjäytyminen osoitettiin detektiokitillä ja CuSO₄:lla. Tumavärinä ImmunoRatio -kuva-analyysiä varten käytettiin hematoksyliiniä (laimennos 1:8) (kuva 1B).

Menetelmässä C deparaffinointi, rehydraatio, esikäsitely ja värjääminen tapahtuvat Bond Max -automaatissa (Leica Microsystems, USA). MIB-1-laimennos on 1:200 ja positiivinen värjäytyminen osoitettiin detektiokitillä. Tumaväri osoitettiin yhden minuutin kestäväällä laimentamattomalla hematoksyliini-käsittelyllä (kuva 1C).

Menetelmässä D paraffiinin poisto tehtiin heksaanilla, jonka jälkeen rehydrointi tapahtui alkoholisarjassa. Sitä seurasi ilmakeuhkaus ja keitto Lab Vision Autostainer-värjäysautomaatin (Lab Vision Corporation, USA) esikäsitelymoduulissa (PT Module) pH 9,0 puskurissa (98 °C, 15 minuuttia). MIB-1-vasta-aineinkubaatio (laimennos 1:400) kesti huoneenlämmössä 30 minuuttia. Positiivinen värjäytyminen osoitettiin detektiokitillä ja tumavärinä oli hematoksyliini (kuva 1D).

Kaikissa neljässä menetelmässä polymeeriset detektiokitit (Techmatella Envision-kitti, Bond Maxin oma Polymer Refine Detection -kitti ja Lab Visionin kitti) toimivat samalla periaatteella: primaarivasta-aineinkubaation jälkeen näytettä inkuboidaan kitillä, jossa primaarivasta-aine tunnistetaan HRP-konjugoidulla antihiiri+antikanivasta-aineella. HRP-konjugoitu vasta-aine taas reagoi diaminobentsidiinin kanssa, joka muodostaa ruskean sakan vasta-ainekohtaan.



Kuva 1. Menetelmien A, B, C ja D MIB-1-värjäyksiä. A. Gradus 3:n astrozytooma värjätynä Techmate-automaatilla ja metyyliivihreä-tumavärillä. B. Gradus 4:n astrozytooma eli glioblastooma värjätynä Techmate-automaatilla ja sinisenä näkyvänä hematoksyliini-tumavärillä. C. Gradus 1:n meningeooma värjätynä Bond Max-automaatilla ja hematoksyliini-tumavärillä. D. Gradus 1:n meningeooma värjätynä Lab Vision -automaatilla ja hematoksyliini-tumavärillä. Kaikissa kuvissa ruskea väri ilmoittaa MIB-1-vasta-aineen sitoutumiskohtan tumassa ja suurennos on x 400.

2.2.2 CAS-200-kuva-analyysilaitte

CAS-200 on yhteen rakennettu kokonaisuus mikroskoopista, kahdesta eri aallonpituuksia (ruskeaa ja vihreää väriä) rekisteröivästä kamerasta sekä tietokoneesta. Laitteen toinen kamera tunnistaa MIB-1-vasta-ainepositiivisen tuma-alueen diaminobentsidiinin antaman ruskean värin perusteella, kun taas toinen kamera

tunnistaa metyyli vihreän antaman vihreän tumavärin. Laite digitoi kuvat jatkoprosessointiin. Tumat tunnistetaan tiettyjen tumien muotoa ja kokoa määrittävien yhtälöiden perusteella.

Laite antaa MIB-1-proliferaatioindeksin prosentteina kahdella tavalla: 1) positiivisten tumien pinta-alaosuus kaikesta tumapinta-alasta eli MIB-1-pinta-alaindeksi (MIB1A); 2) positiivisten tumien määrän osuus kaikista tumista eli MIB-1-lukumääräindeksi (MIB1C).

CAS-200-kuva-analyysi suoritettiin kahdella tavalla:

A. Kokonaisista kudoksetä (729 kasvainta). Niistä valittiin kaikkein voimakkaimmin proliferoiva alue, eli alue, jossa oli eniten MIB-1 -immunopositiivisia tumia. Näiltä alueilta määritettiin indeksi 20 eri näkökentästä (400-kertainen suurennos).

B. Samasta voimakkaimmin proliferoivasta kohdasta valittiin osasta tuumoreita kudoksetä monikudoksetä, josta suoritettiin koko 0,6 mm:n läpimittaisen kudoksetä analyysi (x 400). Samaa monikudoksetä ja kudoksetä tutkittiin alla esitettävällä ImmunoRatio-menetelmällä. Monikudoksetä oli yhteensä 124 tuumoria. Tavallisimpia näistä olivat meningeomat (51 kappaletta), astrocytoomat (36 kpl), oligodendrogliomat ja -astrocytoomat (12 kpl), hypofyysiadenoomat (11 kpl) ja schwannoomat (7 kpl).

2.2.3 ImmunoRatio-ohjelmaan perustuva kuva-analyysi

Kokonaisuus koostuu Olympus BH-2-mikroskoopista, Scion Grayscale digitaaliskamerasta (malli CFW-1612C) ja ImmunoRatio-ohjelmasta. Ohjelman ovat kehittäneet Jorma Isola, Arttu Viitanen ja Vilppu Tuominen (Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutin syöpäbiologian laboratorio). Ohjelman analyysialgoritmi perustuu Arnout Ruifrokin ja Dennis Johnstonin julkaisuun (11) ja kuvien otto Image J -ohjelmakirjaston vapaasti saatavilla olevaan lähdekoodiin. Kyseessä on ei-kaupallinen ohjelmisto. Periaatteena on kuvan värjäyksen digitaalinen hajottaminen komponentteikseen.

Tavanomaisessa immunohistokemiallisessa diagnostiikassa tämä tarkoittaa hematoksyliini-austaväriin ja diaminobentsidiinin osoittaman ruskean immunopositiivisuuden "irrottamista" alkuperäisestä kuvasta, jonka jälkeen määritetään immunopositiivisen pinta-alan osuus kaikesta tumapinta-alasta. ImmunoRatio-ohjelmassa värien erottelu perustuu alkuperäisen RGB-kuvan ortonormaaliseen muunnokseen käyttäjän antamien, väreistä riippuvien asetusten perusteella. Tällöin voidaan selvittää jokaisen kahden tai jopa kolmen värin vaikutus näkyvässä värissä. (11)

ImmunoRatio-analyysiä varten objektilasilla oleva kudokset kuvataan kokonaisuudessaan eli skannataan pienellä suurennoksella tietokoneelle. Tämän jälkeen näytettä voidaan tarkastella tietokoneen ruudulta erilaisilla suurennoksilla. Tässä tutkimuksessa skannaamiseen käytettiin Scanscope XT (Aperio)-virtuaalimikroskooppilaitetta. ImmunoRatio-ohjelmaan perustuva kuva-analyysi suoritettiin monikudosblokin kudoksetierioistä siten, että määritettiin koko kudoksetierion alan mittaus (200-kertainen suurennos).

2.2.4 Tilastolliset menetelmät

Proliferaatioindeksien yhteyttä testattiin Pearsonin korrelaatiokertoimella. Ryhmien vertailussa käytettiin non-parametrisiä Mann-Whitney U -testiä ja Kruskal-Wallis -testiä. Testaamiseen käytettiin SPSS-tilasto-ohjelmaa.

2.2.5 Eettiset näkökohdat

Interphone-tutkimuksella on Tampereen yliopistollisen sairaalan eettisen toimikunnan ja Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön lupa (25/023/01).

3 TULOKSET

3.1 MIB-1-proliferaatioindeksi aivokasvainten histologisessa luokituksessa

Tässä tutkimuksessa käytetään 1) kokonaisista histologisista näytepaloista saatuja proliferaatioindeksejä, jolloin tieto on 729 eri kasvaimesta, ja 2) monikudosblokeista saatuja proliferaatioindeksejä, jolloin tieto on 261 kasvaimesta. Näistä toistettavuustutkimuksessa käytettiin monikudosblokkia, jossa oli 124 kasvainta, joista puolestaan onnistuneesti kyettiin analysoimaan 121 tuumoria.

Taulukossa 1 nähdään tutkimuksessa mukana olleet eri kasvaintyyppit ja vastaavat histologiset gradukset (erilaistumisasteet) WHO:n aivokasvainluokituksen (2007) mukaisesti. Kaikista kasvaimista tehtiin kokonaisen kudoksenäytteen proliferaatiomittaus. CAS-200-kuva-analyysilaitteella analysoitiin MIB-1-peroksidaasivärjättyt ja metyyliivihreä-taustavärjättyt näytelasit. Taulukko ilmaisee eri kasvainten proliferaatiota kuvaavat MIB-1-lukumääräindeksin (MIB1C) ja MIB-1-pinta-alaindeksin (MIB1A) mediaaniarvot (median) sekä keskiarvon (mean) ja standardideviaation (SD).

Matalimmat proliferaatioindeksit todettiin gradus 1:n tuumoreilla (pilosyyttisillä astrozytoomilla, schwannoomilla ja gradus 1:n meningeomilla). Vastaavasti korkeimmat proliferaatioindeksit todettiin glioblastoomilla (gradus 4) ja lymfoomilla (gradusta ei määritetä WHO-luokituksessa).

Kuva 2A ilmaisee kasvainten proliferaatiota kuvaavat MIB-1-pinta-alaindeksit (MIB1A) ja kuva 2B MIB-1-lukumääräindeksit (MIB1C) kokonaisissa kudostenleikkeissä histologisen graduksen mukaan. Mukana ovat ne kasvaimet, joille WHO:n luokitus (2007) antaa histologisen graduksen (N = 686). Vertailuun eivät siis kuulu esimerkiksi hemangioomat, lymfoomat ja metastaattiset syövät. MIB-1-pinta-alaindeksit ja MIB-1-lukumääräindeksit erottivat eri gradukset toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (molemmissa $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-testi). Samanlainen löydös saadaan pienemmällä kasvainjoukolla monikudosblokeista mitatuissa proliferaatioindekseissä (N = 261, $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-testi).

Taulukko 1. Aivokasvainten luokitus ja MIB-1-proliferaatioindeksit (MIB1C-lukumääräindeksi; MIB1A-pinta-alaindeksi)

<u>Kasvain</u>	<u>Gradus</u>	<u>N</u>	<u>MIB1C</u> mediaani(keskiarvo \pm SD)	<u>MIB1A</u> mediaani(keskiarvo \pm SD)
<u>NEUROEPITELIAISET TUUMORIT</u>				
Astrocytoomat				
Diffuusi astrocytooma	2	31	10,4 (10,3 \pm 3,8)	6,2 (6,4 \pm 2,4)
Anaplastinen astrocytooma	3	15	20,5 (24,9 \pm 13,9)	13,3 (19,3 \pm 14,3)
Glioblastooma	4	106	36,8 (36,0 \pm 11,0)	29,2 (30,6 \pm 14,1)
Pilosyytinen astrocytooma	1	12	5,1 (4,6 \pm 3,4)	3,0 (2,8 \pm 2,0)
Pleomorfinen ksantoastrocytooma	2	2	3,1 ja 6,4	2,0 ja 3,7
Oligodendroglioomat				
Oligodendrogliooma	2	30	10,6 (10,7 \pm 6,2)	6,2 (6,7 \pm 4,2)
Anaplastinen oligodendrogliooma	3	3	30,8 (26,4 \pm 13,8)	22,4 (19,7 \pm 12,1)
Sekamuotoiset glioomat				
Oligoastrocytooma	2,3	25	16,7 (18,9 \pm 13,7)	10,4 (13,9 \pm 12,4)
Ependymoomat				
Ependymooma	2	4	11,3 (11,9 \pm 3,5)	6,8 (7,2 \pm 2,2)
Anaplastinen ependymooma	3	2	7,8 ja 31,6	4,7 ja 23,2
Myksopapillaarinen ependymooma	1			
Subependymooma	1	1	8,5	5,9
Suonipunoksen tuumorit				
Papillooma	1			
Karsinooma	3			
Neuronaaliset ja sekamuotoiset neuronaalis-gliaaliset tuumorit	1,3	5	3,7 (4,8 \pm 4,3)	2,1 (2,8 \pm 2,1)
Neuroblastoomat				
	4			
Käpytisäkkeen tuumorit				
	1,3	4	7,6 (8,1 \pm 6,9)	4,2 (4,8 \pm 4,1)
Embryonaaliset tuumorit				
Medulloblastooma	4	1	52,3	54,9
Supratentoriaalinen primitiivinen neuroektodermaalinen tuumori (PT)	4	1	62,3	82,5
<u>AIVOKALVOJEN TUUMORIT</u>				
Meningeoomat				
Meningoteliaalinen	1	282	5,0 (5,8 \pm 3,7)	3,0 (3,5 \pm 2,3)
Meningoteliaalinen	1	112	4,9 (5,5 \pm 3,3)	2,9 (3,3 \pm 2,0)
Fibroblastinen	1	63	5,9 (7,0 \pm 4,7)	3,3 (4,2 \pm 3,0)
Transitioaalinen	1	73	4,6 (5,3 \pm 3,0)	2,8 (3,1 \pm 1,8)
Muut gradus 1 meningeoomat	1	34	4,8 (5,6 \pm 3,7)	2,8 (3,4 \pm 2,4)
Atyyppinen meningeooma	2	24	9,8 (11,5 \pm 7,1)	5,9 (7,2 \pm 4,8)
Anaplastinen meningeooma	3			
Mesenkymaaliset tuumorit				
Hemangiooma	1	30	1,0 (1,3 \pm 1,6)	1,0 (1,2 \pm 1,4)
Hemangioblastooma	1	7	6,4 (6,5 \pm 4,6)	3,7 (3,9 \pm 2,7)
<u>PERIFEEERISTEN HERMOJEN TUUMORIT</u>				
Schwannoma (Neurilemmoma, Neurinoma)	1	63	6,5 (6,7 \pm 2,9)	3,8 (4,0 \pm 1,8)
Neurofibroma				
	1			
Maligni perifeerinen hermotuppituumori (MPNST)	3,4			
<u>LYMFOOMAT JA HEMATOLOGISET TUUMORIT</u>				
Lymfoomat		5	52,4 (51,8 \pm 10,0)	55,1 (57,3 \pm 22,3)
Plasmasytooma		1	36,3	29,7
<u>ITUSOLUTUUMORIT</u>				
Germiinooma		1	56,6	65,2
Embryonaalinen karsinooma				
Ruskuaispussituumori				
Koriokarsinooma				
Teratooma				
<u>HYPOFYYSIN TUUMORIT</u>				
Adenooma	1	64	3,0 (3,5 \pm 2,3)	1,7 (2,0 \pm 1,3)
Kraniofaryngeooma	1	9	7,5 (11,1 \pm 10,2)	4,3 (7,2 \pm 7,3)
Granulaarisolutuumori	1	1	2,9	2

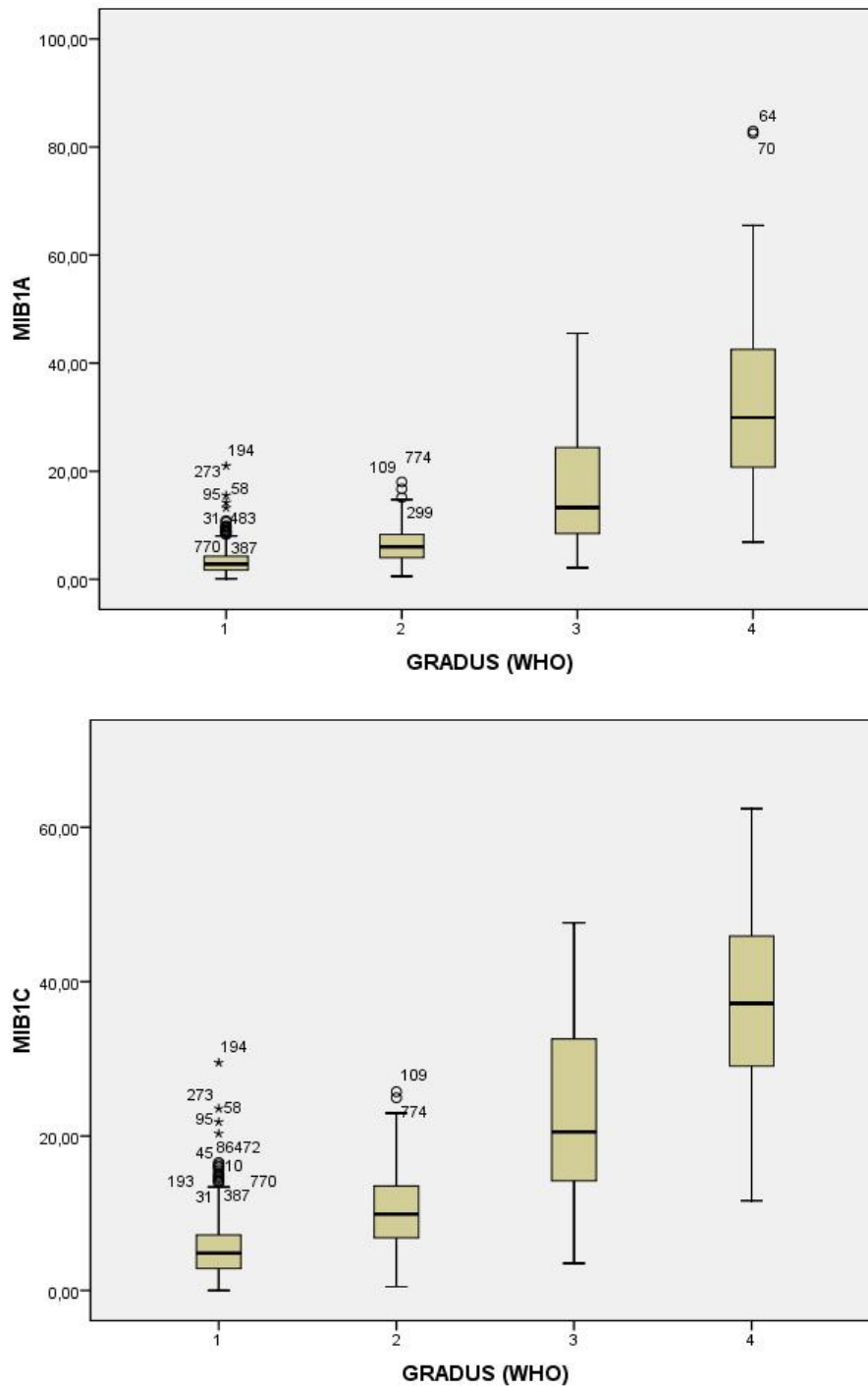
Tavallisimpien aivokasvainten, gliomien ja meningeomien, proliferaatioindeksejä vertailtiin myös histologisten erilaistumisasteiden (gradusten) välillä. Diffuusit astrozytoomat, yleisimmät gliomat, erosivat tilastollisesti merkitsevästi MIB-1-positiivisuuden mukaan eri gradusten välillä (kokoleikkeet: kuvat 3A ja 3B; monikudosblokkilieriöt: $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-testi). Samanlainen tilastollisesti merkitsevä ero oli meningeomien eri histologisten erilaistumisasteiden välillä (kokoleikkeet: Kuvat 4A ja 4B; monikudosblokkilieriöt: $p < 0,001$, Mann-Whitney U-testi).

3.2 Värjäysmenetelmien ja kuva-analyysin toistettavuus

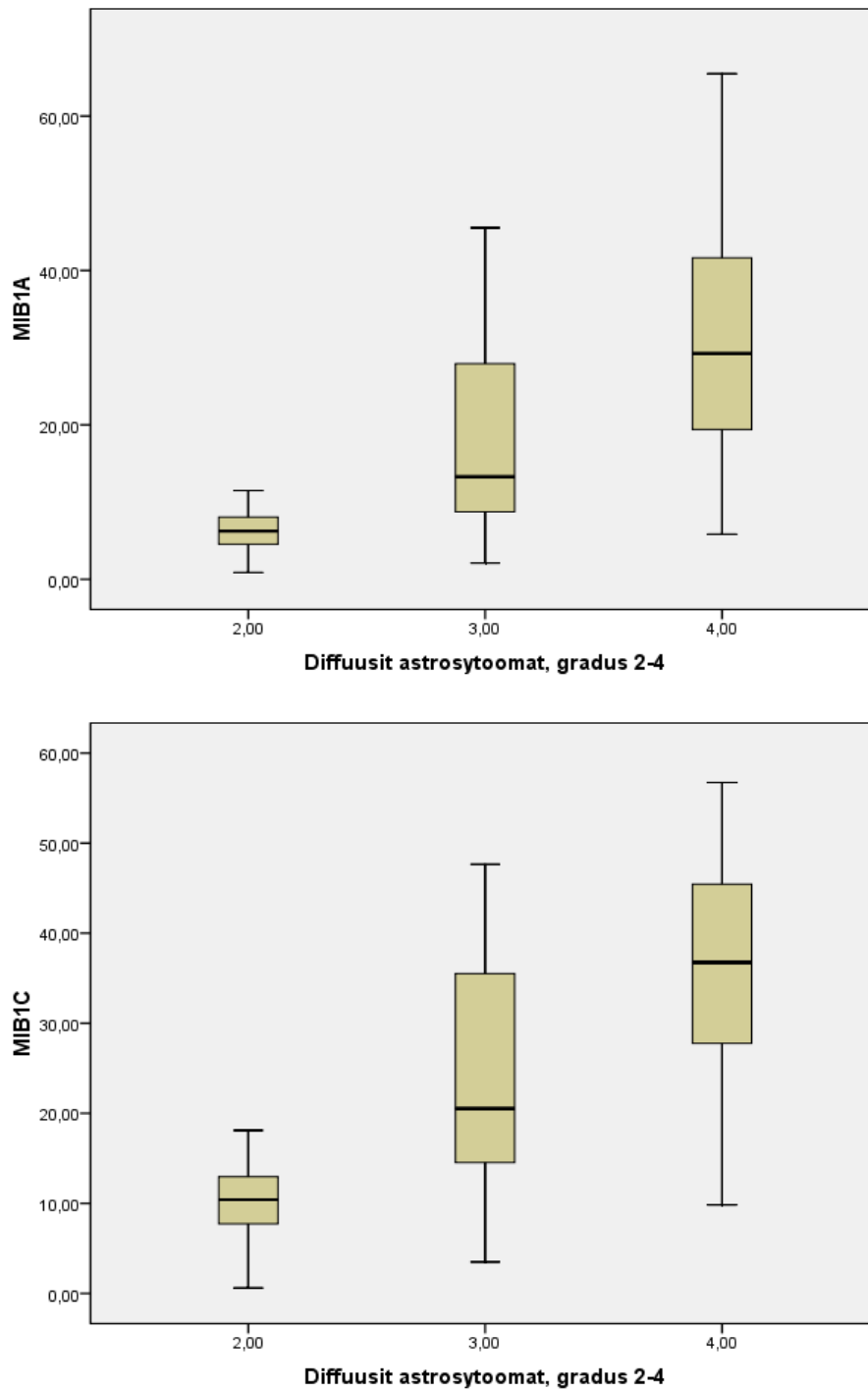
Aikaisemmin Laboratoriokeskuksen patologian laboratoriossa käytettiin MIB-1-värjäksiä, joissa peroksidaasivärjätty lasit taustavärjättiin metyyliivihreällä käyttäen Techmate-immunovärjäysautomaattia. Näin proliferoivat tumat värjäytyivät ruskeina ja proliferoimattomat vihreinä (kuva 1A). CAS-200-kuva-analyysilaitte analysoi kahdella kameralla molemmat värit ja sen ohjelma tuotti näytteestä prosentuaalisen MIB-1-lukumäärä- ja MIB-1-pinta-alaindeksin (menetelmä A). Näitä määrittämiä on tässä työssä käytetty "kultaisena standardina", joihin muiden värjäysautomaattien ja ImmunoRatio -kuva-analyysilaitteella analysoitujen näytteiden tuloksia verrattiin (taulukko 2).

Taulukko 2. Eri menetelmien värjäykset ja niissä käytetyt värjäys- ja kuva-analyysiautomaatit.

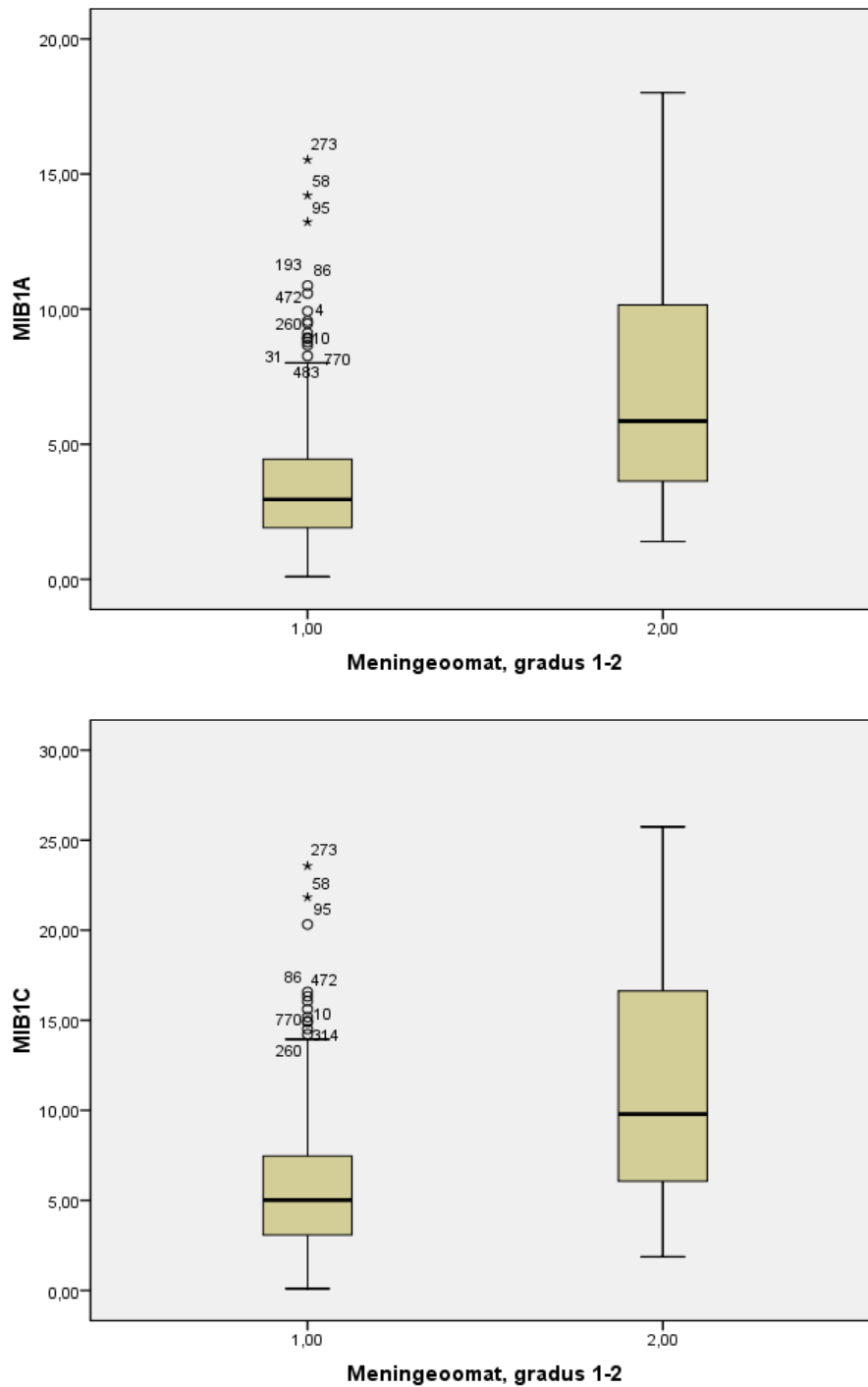
<u>Vasta-aine</u> <u>laimennos</u>	<u>Tumaväri</u>	<u>Värjäysautomaatti</u>	<u>Kuva-ana-</u> <u>lyysilaitte</u>
Menetelmä A. MIB-1 1:110	metyyliivihreä	Techmate	CAS-200
Menetelmä B. MIB-1 1:110	hematoksyliini	Techmate	ImmunoRatio
Menetelmä C. MIB-1 1:200	hematoksyliini	Bond Max	ImmunoRatio
Menetelmä D. MIB-1 1:400	hematoksyliini	Lab Vision	ImmunoRatio



Kuva 2. MIB-1-pinta-alaindeksi (2A, ylempi kuva) ja MIB-1-lukumääräindeksi (2B, alempi kuva) kokonaisista kudოსleikkeistä aivokasvainten eri graduksissa (molemmissa kuvissa: gradus 1: N = 440; gradus 2: N = 97; gradus 3: N = 41; gradus 4: N = 108; $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-testi).



Kuva 3. MIB-1-pinta-alaindeksi (3A, ylempi kuva) ja MIB-1-lukumääräindeksi (3B, alempi kuva) kokonaisista kudisleikkeistä diffuusien astrozytoomien eri graduksissa (molemmissa kuvissa: gradus 2: N = 31; gradus 3: N = 15; gradus 4: N = 106; $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-testi).

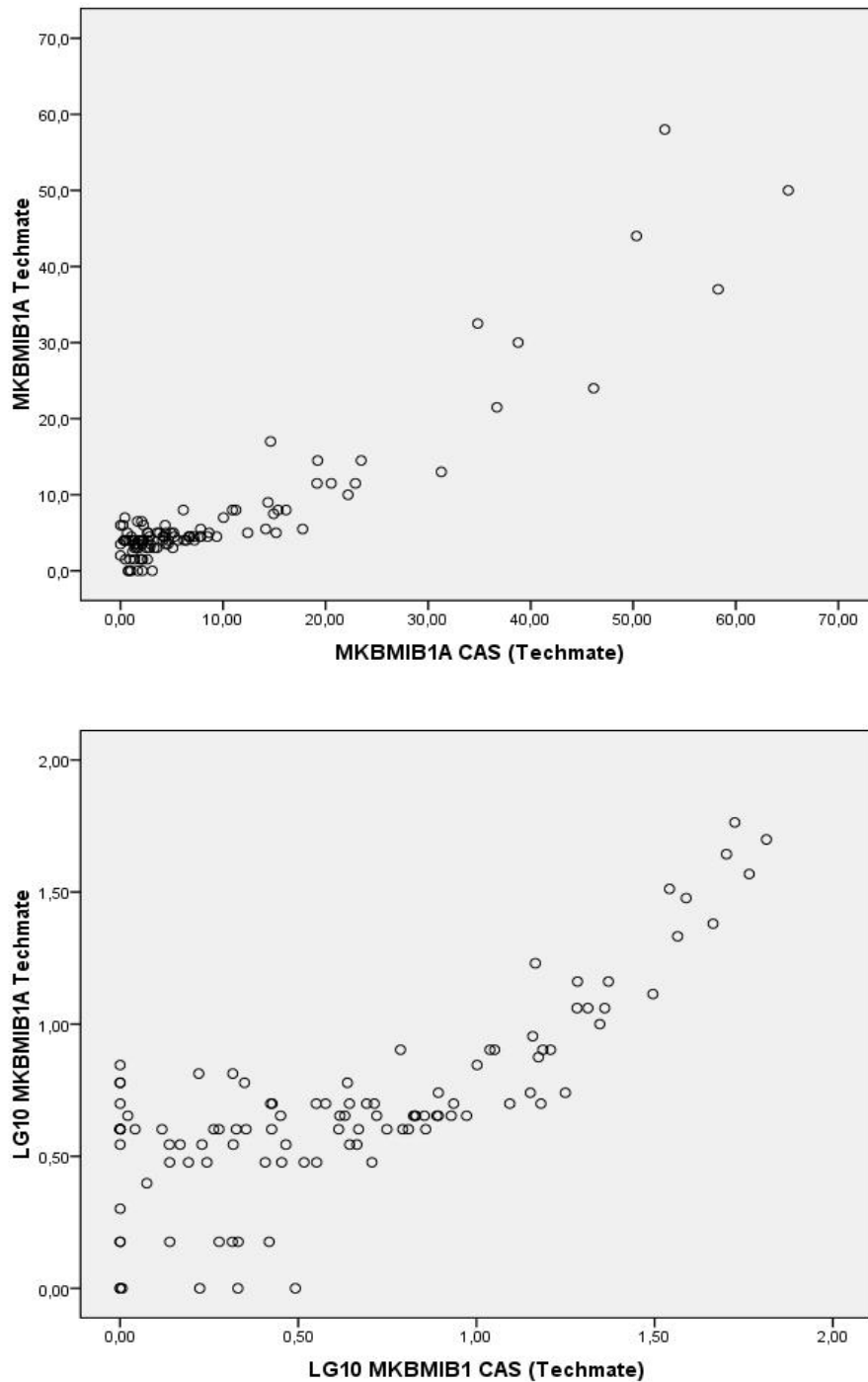


Kuva 4. MIB-1-pinta-alaindeksi (4A, ylempi kuva) ja MIB-1-lukumääräindeksi (4B, alempi kuva) kokonaisista kudosleikkeistä meningeoomien eri graduksissa (molemmissa kuvissa: gradus 1: N = 282; gradus 2: N = 24; $p < 0,001$, Mann-Whitney U-testi).

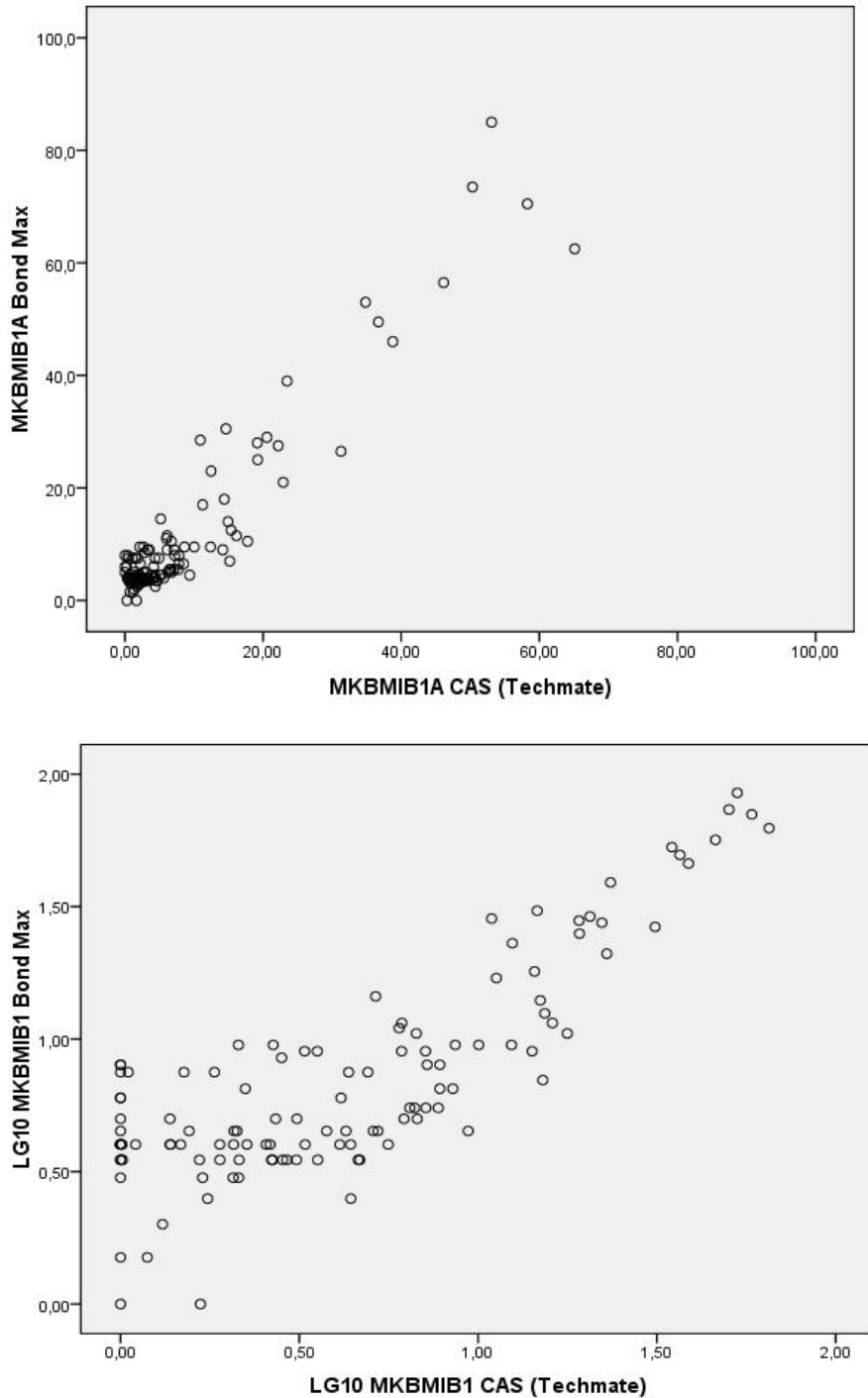
Kaikissa analyyseissä käytettiin samaa monikudosblokkia, josta onnistuneesti kyettiin analysoimaan 121 aivokasvainta. Kun menetelmää A verrattiin samalla Techmate-automaatilla MIB-1-värjättyihin (laimennos 1:110), hematoksyliini-taustavärjättyihin ja ImmunoRatio-kuva-analyysilaitteella ja -ohjelmalla analysoituihin näytteisiin (menetelmä B), saatiin menetelmien välille hyvä toistettavuus (proliferaatio-indeksit: $r = 0,924$, $p < 0,001$; logaritimuunnetut arvot: $r = 0,778$, $p < 0,001$; kuvat 5A ja 5B, taulukot 3, 4 ja 5).

Vastaavasti menetelmä A:n ja menetelmä C:n (Bond Maxin MIB-1- ja hematoksyliinivärjättyt näytteet ImmunoRatio-kuva-analysointilaitteella analysoituna) välinen toistettavuus oli hyvä, vaikka menetelmä A antoi matalampia arvoja (Kuvat 6A ja 6B, Taulukot 3, 4 ja 5). Samoin hyvä toistettavuus oli menetelmä A:n ja menetelmä D:n (Lab Visionin MIB-1- ja hematoksyliinivärjättyt näytteet ImmunoRatio-kuva-analysointilaitteella analysoituna) välillä, mutta nyt menetelmä A antoi hiukan korkeampia arvoja (kuvat 7A ja 7B, taulukot 3, 4 ja 5).

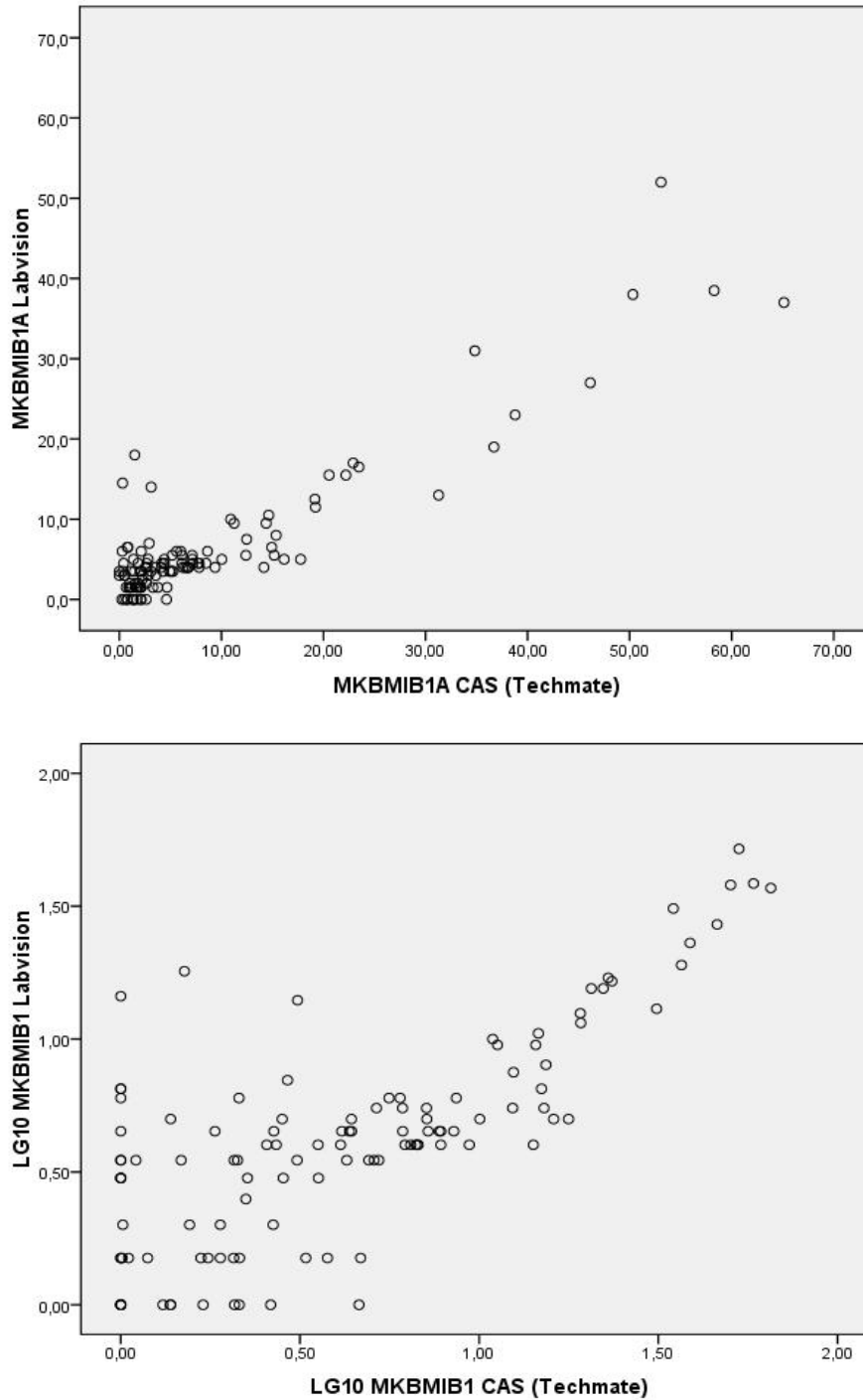
Menetelmä D:n ja menetelmä B:n toistettavuus oli erittäin hyvä (kuvat 8A ja 8B), kun taas menetelmä D:n ja menetelmä C:n vertailussa edellinen antoi matalampia arvoja (kuvat 9A ja 9B, taulukot 3, 4 ja 5).



Kuva 5. MIB-1-pinta-alaindeksien toistettavuus Techmate-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, CAS-200-kuva-analyyysilaitteella analysoitujen arvojen ja Techmate-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, ImmunoRatio-kuva-analyyysilaitteella analysoitujen arvojen välillä ($r = 0,924$, $p < 0,001$; 5A, ylempi kuva). Logaritmuunnetuilla arvoilla $r = 0,778$, $p < 0,001$ (5B, alempi kuva).



Kuva 6. MIB-1-pinta-alaindeksien toistettavuus Techmate-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, CAS-200-kuva-analysilaitteella analysoidujen arvojen ja Bond Max-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, ImmunoRatio-kuva-analysilaitteella analysoidujen arvojen välillä ($r = 0,945$, $p < 0,001$; 6A, ylempi kuva). Logaritmimuunnetuilla arvoilla $r = 0,818$, $p < 0,001$ (6B, alempi kuva).



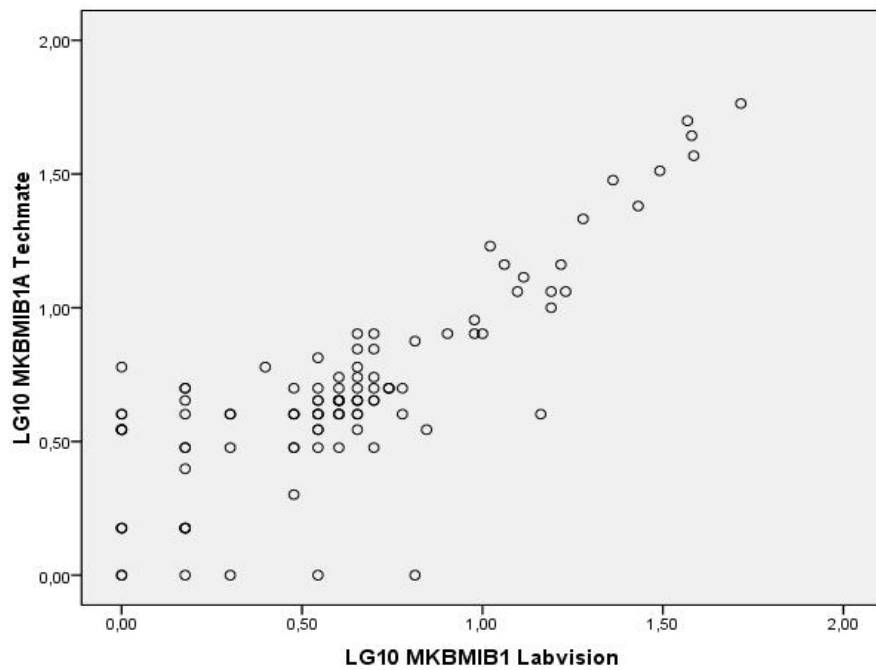
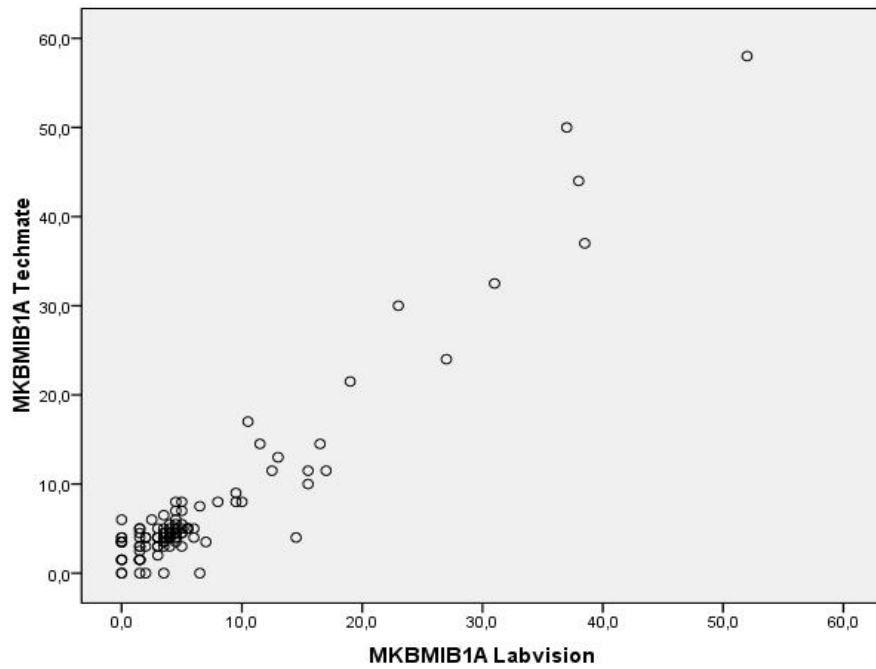
Kuva 7. MIB-1-pinta-alaindeksien toistettavuus Techmate-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, CAS-200-kuva-analyysilaitteella analysoitujen arvojen ja Lab Vision-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, ImmunoRatio-kuva-analyysilaitteella analysoitujen arvojen välillä ($r = 0,903$, $p < 0,001$; 7A, ylempi kuva). Logaritmimuunnetuilla arvoilla $r = 0,743$, $p < 0,001$ (7B, alempi kuva).

Taulukko 3. Värjäys- ja kuva-analyysimenetelmien toistettavuus proliferaatioindeksien välillä. Kaikkien korrelaatiokerrointen (r) $p < 0,001$.

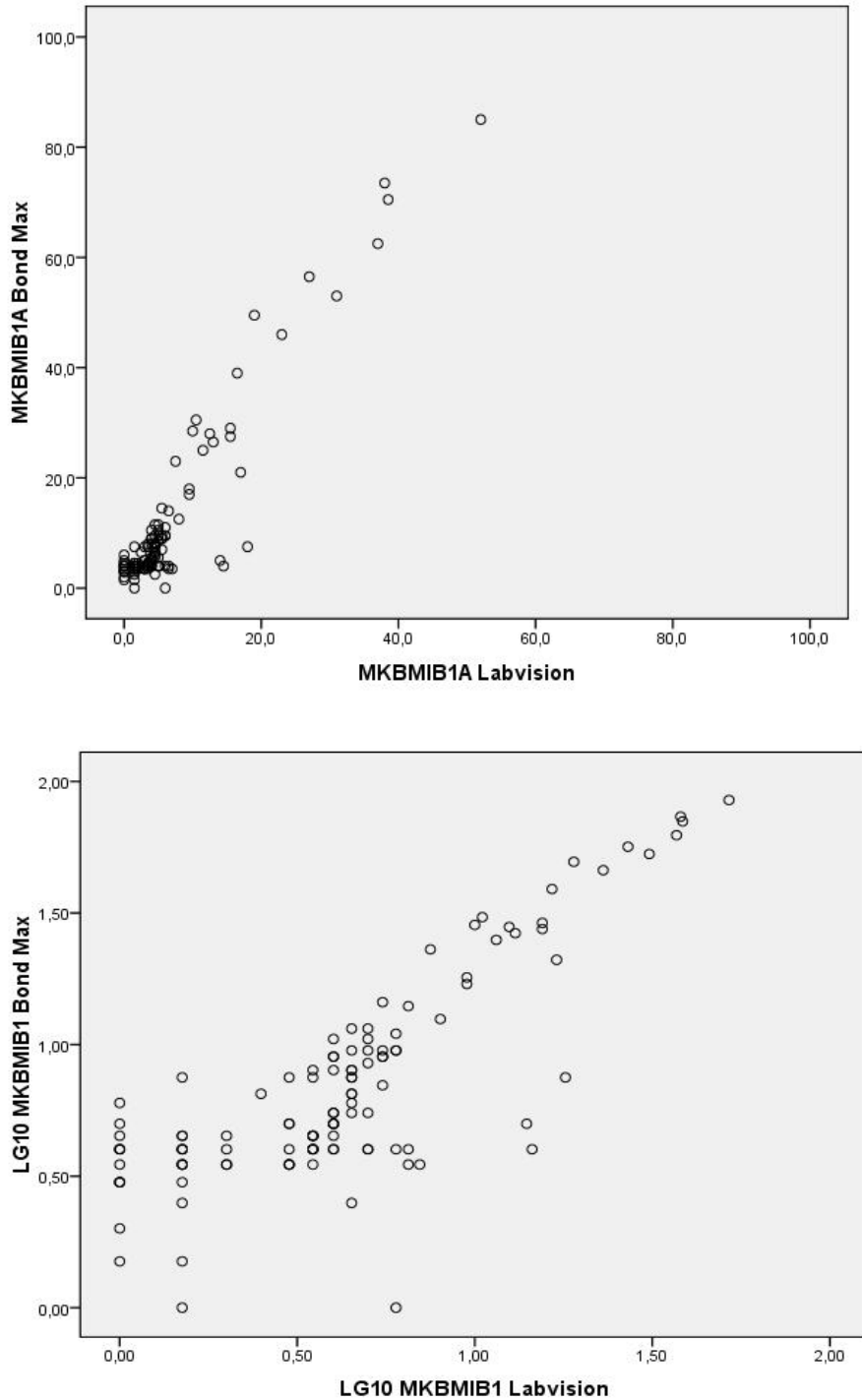
	Menetelmä A	Menetelmä B	Menetelmä C	Menetelmä D
Menetelmä A				
r-arvo	1,000	0,924	0,945	0,903
Menetelmä B				
r-arvo	0,924	1,000	0,954	0,956
Menetelmä C				
r-arvo	0,945	0,954	1,000	0,939
Menetelmä D				
r-arvo	0,903	0,956	0,939	1,000

Taulukko 4. Värjäys- ja kuva-analyysimenetelmien toistettavuus proliferaatioindeksien logaritminuunnosten välillä. Kaikkien korrelaatiokerrointen (r) $p < 0,001$.

	Menetelmä A	Menetelmä B	Menetelmä C	Menetelmä D
Menetelmä A				
r-arvo	1,000	0,778	0,818	0,743
Menetelmä B				
r-arvo	0,778	1,000	0,878	0,814
Menetelmä C				
r-arvo	0,818	0,878	1,000	0,803
Menetelmä D				
r-arvo	0,743	0,814	0,803	1,000



Kuva 8. MIB-1-pinta-alaindeksien toistettavuus Lab Vision-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, ImmunoRatio-kuva-analysilaitteella analysoitujen arvojen ja Techmate-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, ImmunoRatio-kuva-analysilaitteella analysoitujen arvojen välillä ($r = 0,956$, $p < 0,001$; 8A, ylempi kuva). Logaritmimuunnetuilla arvoilla $r = 0,814$, $p < 0,001$ (8B, alempi kuva).



Kuva 9. MIB-1-pinta-alaindeksien toistettavuus Lab Vision-immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, ImmunoRatio-kuva-analysilaitteella analysoitujen arvojen ja Bond Max -immunovärjäysautomaatilla värjättyjen, ImmunoRatio-kuva-analysilaitteella analysoitujen arvojen välillä ($r = 0,939$, $p < 0,001$; 9A, ylempi kuva). Logaritmimuunnetuilla arvoilla $r = 0,803$, $p < 0,001$ (9B, alempi kuva).

Taulukko 5. Eri menetelmien antamien MIB-1-indeksi-arvojen keskinäinen yhteys, kun pidetään riippuvuutta lineaarisena.

$$\text{Menetelmä A} = 1,25 * \text{Menetelmä B} - 0,08$$

$$\text{Menetelmä A} = 0,75 * \text{Menetelmä C} - 0,18$$

$$\text{Menetelmä A} = 1,32 * \text{Menetelmä D} + 0,12$$

$$\text{Menetelmä C} = 1,63 * \text{Menetelmä B} + 0,06$$

$$\text{Menetelmä D} = 0,88 * \text{Menetelmä B} + 0,21$$

$$\text{Menetelmä D} = 0,51 * \text{Menetelmä C} + 0,73$$

Menetelmä C antoi siis yleisesti korkeampia proliferaatioindeksi-arvoja kuin muut menetelmät. Kun menetelmä C:n toistettavuutta muihin menetelmiin nähden yritettiin parantaa MIB-1-vasta-aineen laimentamisella, toistettavuus heikkeni merkittävästi (taulukko 6).

Taulukko 6. Värjäys- ja kuva-analyysimenetelmien toistettavuus proliferaatioindeksien välillä. Menetelmä C:ssä MIB-1-vasta-aineen laimennokset ovat 1:200 (alkuperäinen laimennos), 1:300 ja 1:400. Kaikkien korrelaatiokerrointen (r) $p < 0,001$.

	Menetelmä C MIB-1 1:200	Menetelmä C MIB-1 1:300	Menetelmä C MIB-1 1:400
Menetelmä A			
r-arvo	0,945	0,863	0,588
Menetelmä B			
r-arvo	0,954	0,889	0,682
Menetelmä D			
r-arvo	0,939	0,898	0,669

4 POHDINTA

4.1 Eri kasvainten proliferaatioindeksit

Kun tutkimuksessa kaikki aivotuumorit käsiteltiin yhtenä joukkona, saatiin histologisten gradusten välille tilastollisesti merkitsevät erot. Tämä on tärkeää, koska tuloksen perusteella voidaan päätellä, että proliferaatiolaskennasta on hyötyä yleisestikin aivokasvaimia luokiteltaessa. Tässä tutkimuksessa laajasta kasvainsarjan joukosta tarkasteltiin tarkemmin tavallisimpia kasvaimia, aivojen tukisoluista syntyviä glioomia ja aivokalvoista alkunsa saavia meningeoomia.

Glioomista voidaan esimerkkinä nostaa esille astrozytoomien proliferaatioindeksejä (taulukko 1). Astrozytoomiin kuuluvat pilosyyttiset astrozytoomat (gradus 1, MIB-1-proliferaatioindeksi: mediaani 5,1 ja keskiarvo 4,6), diffuusit astrozytoomat (gradus 2, mediaani 10,4 ja keskiarvo 10,3), anaplastiset astrozytoomat (gradus 3, mediaani 20,5 ja keskiarvo 24,9) sekä glioblastoomat (gradus 4, mediaani 36,8 ja keskiarvo 36,0). Nämä arvot ovat selvästi korkeampia kuin aiemmin kirjallisuudessa esitetyt (12, 13). Tähän eroon on varmasti useampia eri syitä. Niistä hyvin keskeinen voi olla se, että tässä tutkimuksessa proliferaatioindeksi määritettiin kasvaimen kaikkein voimakkaimmin proliferoivimmalta alueelta kuva-analysimenetelmällä. Useissa muissa tutkimuksissa laskenta on suoritettu silmämääräisesti (7). Glioblastoomien osalta arvojen suureen eroon voi vaikuttaa myös niiden huomattavasti suurempi määrä tässä tutkimuksessa (106 näytettä) verrattuna aiempiin tutkimuksiin. Astrozytoomien eri gradusten välille saatiin tilastollisesti merkitsevät erot, kuten aiemminkin on kirjallisuudessa raportoitu (3, 13).

Meningeoomista tässä tutkimuksessa tarkasteltiin benignejä (gradus 1) ja atyyppisiä meningeoomia (gradus 2). Näille saatiin proliferaatioindeksien keskiarvoiksi 5,8 ja 11,5. Amatyan (2001) suorittamassa aiemmassa tutkimuksessa vastaavat keskiarvot olivat 1,5 ja 8,1 (14). Atyyppisten meningeoomien mediaani omassa tutkimuksessa oli 9,8, mikä on hieman korkeampi kuin Brunan (2007) tutkimuksessa, jossa se oli 6,5 (15). Meningeoomien gradusten välille tässä tutkimuksessa saatiin tilastollisesti merkitsevä ero toisin kuin Brunan suorittamassa tutkimuksessa. Todennäköisesti tässä tutkimuksessa käytetty kuva-analyysiin perustuva mittausmenetelmä on siis tarkempi

kuin Brunan käyttämä silmämääräinen laskenta. Tämän tutkimuksen yleisesti antamiin muuta kirjallisuutta hiukan korkeampiin proliferaatioindekseihin voivat vaikuttaa myös muut laboratoriotekniikkaan liittyvät syyt.

4.2 Immunohistokemialliseen värjäytymiseen vaikuttavat yleiset tekijät

Immunohistokemialliseen värjäystulokseen vaikuttaa lukuisia laboratoriotekniisiä tekijöitä (16). Näytteen käsittely ennen fiksatiivia on tärkeää (lämpötila, aika ja kosteus). Näyte on dissekoitava tarpeeksi pieniksi ja ohuiksi palasiksi ennen fiksatiivia, koska suuremmissa paloissa fiksatiivin penetroituminen on hidasta. Oikean fiksatiivin valinta on tärkeää. Formaliini on tavallisimmin käytetty ja hyvä tähän tarkoitukseen. Fiksointiaika vaikuttaa kudoksen värjäytymiseen. Jos se on liian lyhyt, näyte jää raakaksi eikä säily. Jos aika on liian pitkä, voi tämä vaikuttaa värjäytyvyyteen heikentävästi esimerkiksi MIB-1:n kohdalla.

Kudosprosessointi on yleensä koneellinen ja hyvin standardoitu. Näytteen leikkuu vaikuttaa sen värjäytyvyyteen, esimerkiksi leikkeen paksuudella voi olla hyvinkin paljon merkitystä. Erilaiset esikäsittelyt, jotka mahdollistavat tutkittavien proteiinien saatavuuden vasta-ainemolekyyleille, ovat tärkeitä. Nämä tehdään mm. yhdistämällä lämpötila (100 °C) ja voimakas puskuri.

Primaarivasta-aineen valintaan (tunnistettava oikea laji, sovittava kyseiselle fiksaatiolle ja esikäsittelylle) ja käyttöön voidaan vaikuttaa paljonkin (laimennus, aika, lämpötila ja diluentti). Blokkauksella ja pesuilla estetään epäspesifinen vasta-aineen sitoutuminen. Sekundaarivasta-aine ja vasta-aineiden detektointi ovat myös seikkoja, jotka vaikuttavat kudoksen värjäytymiseen.

4.3 MIB-1-värjäysmenetelmien ja kuva-analyysin toistettavuus

Tässä työssä yleisesti eri määritysmenetelmien toistettavuus keskenään oli hyvää tasoa (r-arvo vaihteluväli 0,903–0,956). Jos standardina pidetään Techmate-automaatilla tehtyjä ja CAS-200-kuva-analyysilaitteella määritettyjä proliferaatioindeksejä (menetelmä A), antoi ImmunoRatio-kuva-analyysilaitteella tehty menetelmä C (Bond

Max) systemaattisesti korkeampia arvoja ja samalla ImmunoRatiolla tehty menetelmä D (Lab Vision) systemaattisesti matalampia arvoja. Vasta-aine-laimennuksillakaan ei saatu Bond Maxin arvoja lähemmäksi muita määrityksiä, vaan tällöin mittausten välinen toistettavuus heikkeni jyrkästi (taulukko 6).

Paras toistettavuus saatiin menetelmä B:n (Techmate) ja menetelmä D:n (Lab Vision) välillä. Tämä johtuu varmasti osittain siitä, että kuva-analyysi näissä värjäyksissä suoritettiin samalla ImmunoRatio-kuva-analyysilaitteella. Millään uudella menetelmällä ei siis päästy täsmälleen samoihin tuloksiin kuin vanhalla CAS-200-automaatilla. Toisaalta Lab Visionin antamat proliferaatioarvot ovat ehkä lähempänä kirjallisuuden antamia arvoja (7, 15).

Kuva-analyysin on yleisesti todettu parantavan proliferaatiomittauksen toistettavuutta, kun verrataan eri observojien tekemiä mittauksia (4). Tässä tutkimuksessa käytetyt kuva-analyysimenetelmät ovat tyystin erilaiset. CAS-200-mittaus perustuu valon eri aallonpituuksien (ruskean ja vihreän) arvioon kahdella kameralla, kun taas ImmunoRatio perustuu menetelmään, jossa värjäys "hajotetaan" digitaalisesti komponenteikseen (11). Tumavärillä (metyylivihreä: menetelmä A; hematoksyliini: menetelmät B, C ja D) voi olla myös merkitystä laskettujen immunopositiivisten solujen fraktioon. Tässä yhteydessä voidaan mainita, että ImmunoRatio-ohjelma on julkaistu internetissä yleiseen, ilmaiseen käyttöön ja se toimii osoitteessa <http://imtmicroscope.uta.fi/immunoratioweb/>.

4.4 Muut MIB-1-proliferaatioindeksien vaihtelun syyt

Muita yleisiä proliferaatiomittauksen vaihtelun syitä ovat esimerkiksi kasvaimen sisällä esiintyvä alueittainen proliferaatiovaihtelu, tuumorikudoksen fiksoimisessa tapahtuva vaihteleva viive sekä proliferoivien solujen arvioinnissa esiintyvä tutkijakohtainen vaihtelu (17). Myös laskettavien solujen määrä ja se, sekoittuuko laskentaan ei-neoplastisia soluja, esimerkiksi lymfosyyttejä, vaikuttaa proliferaatioindeksiin.

Mittausalue on tässä työssä valittu kaikkein korkeimman proliferaation alueelta, kun taas osassa aiemmin suoritetuissa tutkimuksissa valinta on tehty satunnaisesti eri kasvainalueilta. Mittausalueen valintaa on mm. Persson (2008) tutkinut (18). Tuossa työssä glioblastoomien MIB-1-proliferaatioindeksin (PI) mediaani oli 6 %, kun määrittäminen

tehtiin koko kudosleikkeen alueelta. Kun määrittäminen tehtiin kasvaimen selvästi gradus 4:ää vastaavalta alueelta, PI-mediaani oli 12 %. Jos mittaus tehtiin kaikkein suurimman proliferaation alueelta, kuten omassa tutkimuksessa, PI-mediaani oli 17 %.

4.5 Lopuksi

Ki-67-proliferaatiomittaus on tullut keskeiseksi osaksi patologistasta kasvindiagnostiikkaa. Ki-67-värjäystä on pyritty kehittämään nopeammaksi, ja jo nyt on mahdollista määrittää kasvainten proliferaatioindeksejä leikkausten aikana. Uusi nopeampi menetelmä (Ultrarapid Ki-67) mahdollistaa proliferaation määrittämisen 15 minuutissa, jolloin neuropatologi ja neurokirurgi voivat hyödyntää mittauksen tuloksia diagnostiikassa ja leikkauksen laajuutta arvioitaessa. Ultrarapid Ki-67-indeksit ovat korreloineet hyvin aiempien proliferaatiomääritysten kanssa. (19)

Tämän tutkimuksen antamien tulosten perusteella voidaan todeta proliferaatiomittauksen olevan keskeinen osa aivokasvainten histologista arviointia. Tutkimuksessa osoitettiin määritysten voimakas korrelaatio histologiseen gradukseen sekä glioomissa että meningeoomissa. Kuitenkin eri värjäys- ja kuva-analyysimenetelmien antamien proliferaatioindeksien ero oli varsin huomattava. Proliferaatioprosenttien vaihtelevuus tämän ja muiden tutkimusten välillä tarkoittaa sitä, että menetelmien standardointia varten tarvitaan laajoja monikeskustutkimuksia ja yhteistyötä eri laboratorioiden välillä. Ennen näitä jokaisen laboratorion täytyy kehittää omat viitearvonsa.

LÄHTEET

- 1) Pukkala E, Sankila R, Rautalahti M. Syöpä Suomessa 2006. Suomen Syöpäyhdistyksen julkaisu nro 71. Suomen Syöpäyhdistys, Helsinki 2006.
- 2) Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4. painos. Lyon: IARC Press 2007.
- 3) Sallinen P, Haapasalo H, Visakorpi T, Helen P, Rantala I, Isola J, Helin H. Prognostication of astrocytoma patient survival by Ki-67 (MIB-1), PCNA, and S-phase fraction using archival paraffin-embedded samples. *Journal of Pathology* 1994(a);174:275–82.
- 4) Sallinen P, Haapasalo H, Kerttula T, Rantala I, Kalimo H, Collan Y, Isola J, Helin H. Sources of variation in the assessment of cell proliferation using proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1994(b);16:261–8.
- 5) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 1983;31:13–20.
- 6) Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Journal of Pathology* 1992;168:357–63.
- 7) Johannessen A, Torp S. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathology Oncology Research* 2006;12:143–7.
- 8) Tham K, Page D. AgNOR and Ki-67 in breast lesions. *American Journal of Clinical Pathology* 1989;92:518–20.
- 9) Rautiainen E, Haapasalo H, Sallinen P, Rantala I, Helen P, Helin H. Histone mRNA in-situ hybridization in astrocytomas: a comparison with PCNA, MIB-1 and mitoses in paraffin-embedded material. *Histopathology* 1998;32:43–50.
- 10) Juan G, Traganos F, James W, Ray J, Roberge M, Sauve D, Anderson H, Darzynkiewicz Z. Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis. *Cytometry* 1998;32:71–7.
- 11) Ruifrok A, Johnston D. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 2001;23 :291–9.
- 12) Khalid H, Shibata S, Kishikawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 1997;80:2133–40.
- 13) Hsu D, Louis D, Efird J, Hedley-Whyte E. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1997;56:857–65.
- 14) Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K, Kurisu K, Nishisaka T, Fukuhara T, Inai K. Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21^{WAF1}, and p27^{KIP1} expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Human Pathology* 2001;32:970–5.
- 15) Bruna J, Brell M, Ferrer I, Gimenez-Bonafe P, Tortosa A. Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathology* 2007;27:114–20.

- 16) Taylor C, Shi S-R, Barr N, Wu N. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls and standardization. Kirjassa: Dabbs D, toim. Diagnostic Immunohistochemistry, 2. painos. Yhdysvallat: Churchill Livingstone, 2006.
- 17) Haapasalo H. Mitoosiaktiiviteetin arviointi. Solubiologi 1992;11:68–72.
- 18) Persson A, Englund E. Different assessments of immunohistochemically stained Ki-67 and hTERT in glioblastoma multiforme yield variable results: a study with reference to survival prognosis. Clinical Neuropathology 2008;27:224–33.
- 19) Haapasalo J, Mennander A, Helen P, Haapasalo H, Isola J. Ultrarapid Ki-67 immunostaining in frozen section interpretation of gliomas. Journal of Clinical Pathology 2005;58:263–8.