

Rintasyövän immunohistokemiallisten värjäysten
automaattisen kuva-analyysin validointi kliiniseen
diagnostiikkaan



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Sanna Ruotoistenmäki

Pro Gradu

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Alkusanat

Tämä tutkimus on tehty Tampereen yliopiston Lääketieteellisen Teknologian Instituutin syöpäbiologian tutkimusryhmässä ja Seinäjoen keskussairaalan patologian toimintayksikössä huhti-syyskuussa 2009. Suurimmat kiitokset haluan osoittaa työni ohjaajille, syöpäbiologian professori Jorma Isolalle ja sairaalaselubiologi Mervi Jumppaselle. Kiitos asiantuntevista neuvoista ja kannustuksesta työn aikana sekä mahdollisuudesta suorittaa pro gradu – työ mielenkiintoisen projektin parissa. Kiitos myös Jormalle mahdollisuudesta suorittaa työ Seinäjoella. Suuret kiitokset myös FM Vilppu Tuomiselle ImmunoRatio:n kehittämisestä ja korvaamattomasta avusta tietokoneiden kanssa.

Tämän tutkimuksen rahoitti Etelä-Pohjanmaan Sairaanhoidopiiri, mistä suuret kiitokset. Kiitokset myös Seinäjoen keskussairaalan patologian osaston ylilääkärille, Tapio Vartiolle, mahdollisuudesta suorittaa työ Seinäjoella patologian osastolla. Haluan myös kiittää sairaalaselubiologi Antero Laasosta, joka alkujaan kertoi minulle mahdollisuudesta suorittaa Seinäjoella kesätyön yhteydessä myös pro gradu – työ.

Näytteiden taitavasta leikkaamisesta haluan mitä lämpimimmin kiittää Seinäjoen keskussairaalan patologian osaston laboratoriohoidajia Ritva Kujalaa, Pirjo Pekkala ja Helvi Salmelaa. Suuret kiitokset myös koko patologian osaston henkilökunnalle erittäin mukavasta työilmapiiristä. Vaikka työni ajoittain lisäsi varsinkin immunohistokemian laboratorion työmäärää, sain silti osakseni vain hymyä ja kannustusta. Kiitokset myös Tampereen Lääketieteellisen teknologian instituutin syöpäbiologian tutkimusryhmän välle näytteiden värjäämiseen liittyvistä opastuksista.

Lämpimimmät kiitokset myös perheelleni ja ystäväilleni kannustuksesta työni aikana. Erityiskiitokset toverilleni Moona Lehoselle rauhoittavista neuvoista ja myötäelämisestä kirjoitusprosessin aikana.

Vantaalla 26.1.2010

Sanna Ruotoistenmäki

| | |
|-----------------------------------|---|
| Tekijä: | Sanna Ruotoistenmäki |
| Tutkielman nimi: | Rintasyövän immunohistokemiallisten värjäysten automaattisen kuva-analyysin validointi kliiniseen diagnostiikkaan |
| English title: | Validation of automatic image analysis of immunohistochemical stainings of breast cancer specimens to clinical diagnostics |
| Päivämäärä: | 26.1.2010 Sivumäärä: 71 |
| Laitos: | Bio- ja ympäristötieteiden laitos |
| Oppiaine: | Solubiologia |
| Tutkielman ohjaaja(t): | Prof. Jorma Isola, Lääketieteellisen teknologian instituutti, Tampereen yliopisto ja FT Mervi Jumppanen, Patologian toimintayksikkö, Seinäjoen keskussairaala |
| Tutkielman suorituspaikat: | Lääketieteellisen teknologian instituutti, Tampereen yliopisto ja Patologian toimintayksikkö, Seinäjoen keskussairaala |

Tiivistelmä:

Rintasyövän rutiinidiagnostiikkaan kuuluu syöpäkudoksen estrogeenireseptori (ER)-, progesteronireseptori (PR)- ja Ki-67-statuksien määrittäminen. Määritykset tehdään nykyisin immunohistokemiallisin värjäyksin. Immunohistokemiallisesti värjättyjen kudoksenäytteiden analysointi on yleensä suoritettu silmämääräisesti mikroskoopin okulaarien läpi, mikä on osoittautunut luotettavaksi menetelmäksi selkeästi positiivisten tai negatiivisten näytteiden kanssa. Heikosti positiivisten näytteiden analysoinnissa on kuitenkin havaittu eri arvioitsijoiden ja arviointikertojen välillä suuriakin eroja. Tietokoneavusteiset analyysiohjelmat on kehitetty kudoksenäytteiden immunohistokemiallisten värjäysten analysoinnin apuvälineiksi. Niiden on todettu analysoivan näytteet nopeasti, luotettavasti ja objektiivisesti. Kuva-analyysiohjelmat voivat olla joko kaupallisia tai itse kehitettyjä ja siten usein maksuttomia.

Tässä tutkimuksessa validoitiin Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa kehitetty analyysiohjelma, ImmunoRatio, rintasyövän kliiniseen diagnostiikkaan. Työssä ImmunoRatio osoittautui luotettavaksi ja toimivaksi apuvälineeksi rintasyövän kudoksenäytteiden ER-, PR- ja Ki-67-värjäyksen analysoinnissa. ImmunoRatio:n tulokset vastasivat samojen näytteiden manuaalisesti analysoituja tuloksia. ImmunoRatio:n käyttö vaatii valomikroskoopin ja siihen liitettävän digitaalikameran tai virtuaalimikroskoopialaitteiston käyttöä, mutta kameroiden merkeillä tai malleilla eri ole merkitystä. ImmunoRatio toimii internetissä ja sen käyttö on täysin ilmaista.

Rintasyöpänäytteiden immunohistokemiallisten värjäysten tärkeimmäksi seikaksi ImmunoRatio:ta ajatellen nousi niiden optimointi niin käytettävän vasta-aineen kuin näytteen vastavärjäyksenkin osalta. Värjäyksen suorittavalla laboratorion tai värjäysautomaatilla ei havaittu olevan merkitystä, sillä kahden laboratorion tulokset samoista näytteistä olivat yhteneväisiä. Tutkimuksessa käytettiin kaikkiaan kolmea eri värjäysautomaattia näytteiden immunohistokemiallisiin värjäyksiin: Autostainer (Labvision), Bond Max (Leica Microsystems) ja Benchmark XT (Ventana Medical Systems). ImmunoRatio analysoi onnistuneesti kaikkien värjäysautomaattien optimoituja värjäyksiä. Näytteiden kuvaaminen ImmunoRatio:ta ajatellen osoittautui tutkimuksessa varsin vapaaksi, joten käyttäjä voi kuvata näytteet omien mieltymystensä ja tapojensa mukaisesti. Kaikki tutkimuksessa testatut kuusi digitaalikameraa sekä kaksi virtuaalimikroskoopialaitteistoa toimivat ImmunoRatio:n kanssa moitteettomasti. ImmunoRatio analysoi luotettavasti tif-tiedostojen lisäksi myös jpg-tiedostoja sekä eri suurennoksilla ja mikroskoopin valotuksella kuvattuja kuvia.

Syöpäkasvainten tiedetään olevan hyvin heterogeenisiä, mutta tässä tutkimuksessa ER, PR ja Ki-67 antigeenit värjäytyivät tasaisesti suurissa rintasyöpäkasvaimissa. Lisäksi ImmunoRatio:lla analysoitujen ER:n, PR:n ja Ki-67:n ilmenemiset primaari- ja residivikasvainten välillä olivat myös yhteneväisiä. Täten ImmunoRatio:n todettiin toimivan kliinisen diagnostiikan lisäksi hyvin myös rintasyövän tutkimustyössä.

Avainsanat: immunohistokemia, ER, PR, Ki-67, tietokoneavusteinen analyysi

Author: Sanna Ruotoistenmäki
Title of thesis: Validation of automatic image analysis of immunohistochemical stainings of breast cancer specimens to clinical diagnostics
Finnish title: Rintasyövän immunohistokemiallisten värjäysten automaattisen kuva-analyysin validointi kliiniseen diagnostiikkaan
Date: 26.1.2010 **Pages:** 71
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Prof. Jorma Isola, Institute of Medical Technology, University of Tampere and Ph.D. Mervi Jumppanen, Department of Pathology, Central Hospital of Seinäjoki
Places of performance: Institute of Medical Technology, University of Tampere and Department of Pathology, Seinäjoki Central Hospital

Abstract:

The assessment of breast cancer specimen's estrogen receptor (ER)-, progesterone receptor (PR)- and Ki-67- statuses is a part of the routine diagnostics of a breast cancer patient. Nowadays the assessments are performed by immunohistochemical methods. Immunohistochemically stained tissue specimens are normally analyzed manually by an experienced pathologist through the oculars of a light microscope. This interpretation works well with strongly positive or negative specimens. It is still a subjective method and significant variation between observers and observation times is experienced with weakly positive tumors. Automated image analysis programs have been developed to aid the interpretation of immunostained tissue specimens. Analyzing the slides with image analysis programs is found to be quick and above all, objective. In addition to the commercial image analysis programs on the market there are now a few self made programs which are independent of any commercial or proprietary hardware.

The aim of this work was to validate an image analysis program, ImmunoRatio, to clinical diagnostics of breast cancer. ImmunoRatio has been developed in the Institute of Medical Technology in the University of Tampere. During this validation work, ImmunoRatio proved to be a reliable and handy tool in analyzing the ER, PR and Ki-67 immunohistochemical stainings of breast cancer tissue specimens. The results of ImmunoRatio were concordant with the results of manual analysis of the same specimens. When analyzing the specimens with ImmunoRatio one needs a light microscope and a digital camera or a virtual microscopy system, but there are no requirements for a brand or a model for the camera or the light microscope. ImmunoRatio is freely available in the Internet.

According to this work, the most important step in the immunostaining process of breast cancer tissue specimens for ImmunoRatio was the optimization of the staining. This included both the antibody and the counterstain. ImmunoRatio worked well in analyzing stained specimens from two different laboratories and three different staining machines (Autostainer; Labvision, Bond Max; Leica Microsystems and Benchmark XT; Ventana Medical Systems). These results proved that ImmunoRatio can be used widely with different staining systems and laboratories. The photographing of the stained specimens for ImmunoRatio turned out to be quite free from any restrictions. All the tested six digital cameras and two virtual microscopy systems worked well with ImmunoRatio. In addition, ImmunoRatio analyzed well both .tif and .jpg files and pictures taken with different magnifications and exposures.

Tumors are known to be heterogeneous in nature but in this work the ER, PR and Ki-67 showed no difference in staining between the edges and centers of the tumors. And as expected, all the three antigens levels were significantly similar in patient's primary and secondary breast cancer tumors. Resting on these results, ImmunoRatio was found to be a practical tool also in breast cancer research, in addition to clinical diagnostics.

Keywords: immunohistochemistry, ER, PR, Ki-67, automated image analysis

Sisällysluettelo

Alkusanat

Tiivistelmä

Sisällysluettelo

Lyhenteet

| | |
|--|-----------|
| 1. Johdanto | 8 |
| 1.1 ER ja PR | 8 |
| 1.2 Ki-67 | 9 |
| 1.3 ER:n, PR:n ja Ki-67:n määrittäminen rintasyöpäkudoksesta..... | 10 |
| 1.4 Immunohistokemiallisesti värjättyjen näytteiden analysointi..... | 12 |
| 1.4.1 Näytteiden manuaalinen analysointi | 12 |
| 1.4.2 Näytteiden tietokoneavusteinen analysointi | 14 |
| 1.4.2.1 Kuva-analyysiohjelmat | 16 |
| 1.4.2.2 ImmunoRatio | 18 |
| 1.4.2.3 Virtuaalimikroskopia | 23 |
| 1.4.3 Raja-arvot..... | 24 |
| 2. Tutkimuksen tarkoitus | 26 |
| 3. Materiaalit ja menetelmät..... | 27 |
| 3.1 Näytteiden valinta..... | 28 |
| 3.2 Näytteiden valmistus | 29 |
| 3.3 Näytteiden kuvaus ja analysointi | 32 |
| 3.3.1 ImmunoRatio:n kalibrointi | 33 |
| 3.3.2 ImmunoRatio:n testaus..... | 34 |
| 3.3.3 Näytteiden värjäysteknisten seikkojen tutkiminen..... | 34 |
| 3.3.4 Näytteiden kuvaamiseen liittyvät seikat..... | 35 |
| 3.3.5 ImmunoRatio rintasyövän tutkimuksessa..... | 36 |
| 3.3.6 Tilastoanalyysi | 36 |
| 4. Tulokset..... | 37 |
| 4.1 ImmunoRatio:n kalibrointi | 37 |
| 4.2 Kalibroidun ImmunoRatio:n testaus..... | 39 |
| 4.3 Värjäystekniset ominaisuudet | 40 |
| 4.3.1 Värjäysautomaatit..... | 41 |
| 4.3.2 Kahden laboratorion vertailu ER- ja Ki-67-värjäyksissä | 42 |
| 4.3.3 Vasta-aineen pitoisuuden ja kloonin merkitys ImmunoRatio:n analyysissä | 43 |
| 4.3.4 Vastavärjäyksen merkitys ImmunoRatio:n analyysissä | 44 |
| 4.4 Näytteiden kuvaamiseen liittyvät seikat | 44 |
| 4.4.1 Kuvien lukumäärä per näyte..... | 45 |
| 4.4.2 Mikroskoopin valotus..... | 45 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.4.3 | Kuvien tallennusmuodon vaikutus analyysiin..... | 46 |
| 4.4.4 | Kuvaaminen eri suurennoksilla..... | 47 |
| 4.4.5 | Kuvien rajaaminen | 48 |
| 4.4.6 | Mikroskooppikameroiden ja virtuaalimikroskopialaitteistojen vertailu..... | 49 |
| 4.5 | ER:n, PR:n ja Ki-67:n ilmenemisen heterogeenisuus..... | 51 |
| 4.6 | Primaari- ja residivikasvaimien hormonireseptori- ja Ki-67-statukset..... | 52 |
| 5. | Tulosten tarkastelu | 53 |
| 5.1 | ImmunoRatio:n kalibrointi ja testaus..... | 53 |
| 5.2 | Värjästekniset seikat | 55 |
| 5.2.1 | Värjäysten optimointi | 55 |
| 5.2.2 | Laboratorioiden ja värjäysautomaattien vertailu | 58 |
| 5.2.3 | ImmunoRatio:n ja värjäysautomaattien toistettavuus | 59 |
| 5.3 | Näytteiden kuvaaminen | 59 |
| 5.4 | ImmunoRatio rintasyövän tutkimustyössä..... | 61 |
| 5.5 | Yhteenveto ja tulevaisuuden näkymät | 62 |
| 6. | Lähdeluettelo | 64 |

Lyhenteet

| | |
|-------|--|
| ER | Estrogeenireseptori α |
| PR | Progesteronireseptori |
| DAB | 3',3'-diaminobenzidiini |
| IMT | Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutti |
| Ki-67 | Solusykliin liittyvä tumaproteiini |
| Jpg | Joint Photographic Experts Group |
| Tif | Tagged Image File Format / Tag Image File Format |
| RGB | Red, Green, Blue -värimalli |

1. Johdanto

Rintasyöpäpotilaan kannalta biologisten merkkiproteiinien määrittäminen syöpäkudoksesta on erittäin tärkeää, sillä erilaisten merkkiproteiinien avulla jokaiselle rintasyöpäpotilaalle voidaan suunnitella henkilökohtainen hoito-ohjelma. Hoito-ohjelman avulla pyritään aina mahdollisimman tehokkaaseen hoitoon sivuvaikutukset minimoimalla. Suunnitelmallisella hoidolla vältetään myös potilaalle sopimattomat tai tarpeettomat hoitomuodot.

Rintasyöpäkudoksesta määritettävät merkkiproteiinit voidaan lukea joko prediktivisiksi tai prognostisiksi tekijöiksi. Rintasyöpäkudoksen estrogeenireseptori (ER)- ja progesteronireseptori (PR) -statukset kertovat potilaan soveltuvuudesta tiettyyn hoitomuotoon, eli ne ovat prediktivisiä tekijöitä. Prognostiset tekijät taas vaikuttavat potilaan ennusteeseen ja näihin luetaan esimerkiksi solujen jakautumisesta kertova Ki-67-antigeeni. Jako prediktivisiin ja prognostisiin tekijöihin ei ole kuitenkaan aina yksiselitteistä, sillä esimerkiksi Ki-67-antigeenillä on myös prediktivistä arvoa ja vastaavasti ER- ja PR-statuksilla myös prognostista merkitystä (ks. yleiskatsaus Payne ym., 2008). Rintasyöpäkudoksesta määritettävät ER, PR ja Ki-67 kuuluvat nykyisin rintasyövän rutiinidiagnostiikkaan.

1.1 ER ja PR

ER:a pidetään jopa kaikista tärkeimpänä yksittäisenä rintasyöpäkudoksista määritettävänä tekijänä (ks. yleiskatsaus Payne ym., 2008). Potilaat, joiden rintasyöpä on ER:n suhteen positiivinen, hyötyvät hormonihoidoista enemmän kuin ER:n suhteen negatiiviset potilaat (Pertschuk ym., 1985; Harvey ym., 1999; Stendahl ym., 2006).

ER on tumen transkriptiotekijä, eli se osallistuu geenien ilmenemisen säätelyyn. Se toimii sitomalla estrogeenejä, varsinkin rintasyövän kehitykseen vaikuttavaa estradiolia. Tämän takia ER:n toiminnan estäminen hormonihoidoissa on rintasyöpäpotilaiden yksi tärkeimmistä hoitomuodoista. (ks. yleiskatsaus Payne ym., 2008). ER ilmenee soluissa kahtena eri tyyppinä; ER α :na ja ER β :na (Kuiper ym., 1996). Näistä ER α on paremmin tunnettu ja siten yleisimmin rintasyöpäpotilaiden kasvaimista määritetty (ks. yleiskatsaus Payne ym., 2008). Tässä tutkimuksessa siitä käytetäänkin nimitystä ER.

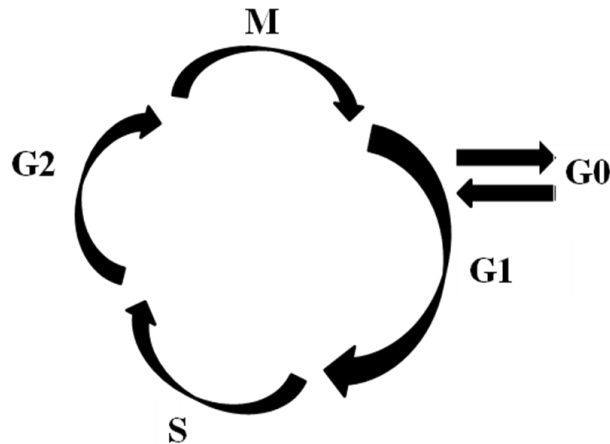
Yksi ER:n säätelemistä geneistä on progesteronia sitova reseptori, PR (ks. yleiskatsaus Payne ym., 2008). PR toimii soluissa ER:n tavoin transkriptiotekijänä ja sen on todettu ilmenevän kolmena eri muotona; PR-A:na, PR-B:nä ja PR-C:nä (Jeltsch ym., 1986; Wei ym., 1996). PR:n uskotaan, ainakin teoriassa, kertovan potilaan soveltuvuudesta hormonihoitoihin jopa ER:a tarkemmin, sillä PR:n ilmeneminen vaatii aina toimivan ER:n (Horwitz ym., 1978 a). Rintasyöpäpotilaiden, joiden syöpäkasvaimet ovat sekä ER:n että PR:n suhteen positiivisia, on todettukin hyötyvän enemmän hormonihoidoista kuin pelkästään ER:n suhteen positiivisten potilaiden (Elledge ym., 2000; Bardou ym., 2003). Lisäksi sekä ER:n että PR:n suhteen positiivisten potilaiden eloonjäämisennusteen on todettu olevan parempi kuin esimerkiksi vain ER:n suhteen positiivisten tai molempien reseptorien suhteen negatiivisten potilaiden (Dunnwald ym., 2007).

ER ja PR eivät aina ilmene tasaisesti ympäri rintasyöpäkudosta, sillä syöpäkasvain ei välttämättä ole kauttaaltaan homogeeninen solumassa (Douglas-Jones ym., 2001; Chung ym., 2007; Rexhepaj ym., 2008). Kasvaimien heterogeenisyys vaikeuttaa rintasyöpäpotilaan hoidon suunnittelua, jos esimerkiksi vain osa kasvaimesta on ER:n suhteen positiivinen (ks. yleiskatsaus Campbell ja Polyak, 2007).. Rintasyöpäkasvaimen syöpäsolujen heterogeenisyydelle on esitetty kaksi mallia: kantasolumalli ja klonaalinen evoluutiomalli. Kantasolumallissa uskotaan syövän niin kutsuttujen kantasolujen erilaistuvan eri suuntiin syövän kehityksen aikana, minkä takia ne voivat ilmentää esimerkiksi eri antigeenejä. Klonaalisessa evoluutiomallissa syöpäsolujen uskotaan ajan myötä keräävän useita mutaatioita, joiden kautta syntyy eri syöpäsolulinjoja eri ominaisuuksineen. Näistä aggressiivisimmat solulinjat pääsevät jakautumaan vapaasti, heikkojen väistyessä tieltä (ks. yleiskatsaus Campbell ja Polyak, 2007).

1.2 Ki-67

Ki-67 on jakautuvien solujen tumissa esiintyvä proteiini. Se ilmenee solun jakautumisen G1-, S-, G2- ja M-vaiheissa muttei lepo- eli G0-vaiheen soluissa (Kuva 1.) (ks. yleiskatsaus Urruticoechea ym., 2005). Ki-67:n rooli solun jakautumisessa on vielä hyvin epäselvä. Sen tiedetään fosforyloituvan seriini ja treoniini aminohapoista ja sen on todettu olevan tärkeä proteiini solun jakautumisen kannalta (Heidebrecht ym., 1996; Starborg ym., 1996). Vaikka sen toiminnasta ei vielä tiedetäkään paljoa, voi sille ominaisen ilmenemisen

avulla kuitenkin selvittää jakautuvien solujen määrän tietyssä solukossa (ks. yleiskatsaus Urruticoechea ym., 2005).



Kuva 1. Solusykli. Ki-67-antigeeni ilmenee kaikissa solusyklin aktiivisissa vaiheissa (G1, S, G2, M), muttei lepo- vaiheessa (G0).

Ki-67 ilmenee solusyklin eri vaiheissa erilailla. Sen ilmeneminen on alhaisimmillaan G1-vaiheessa, jonka jälkeen ilmeneminen kasvaa ollen huipussaan mitoosin aikana (van Dierendonck ym., 1989). du Manoir ym. (1991) esittämän mallin mukaan solut voivat ilmentää Ki-67 -proteiinia kahdella eri tavalla G1-vaiheessa. Ilmeneminen voi olla joko erittäin heikkoa, jolloin solun uskotaan poistuvan solusyklistä G0-vaiheeseen. Solu voi kuitenkin palata takaisin solusykliin, jolloin Ki-67 ilmenee voimakkaasti jälleen S-vaiheesta lähtien. Toisessa vaihtoehdossa Ki-67 ilmenee myös G1-vaiheessa, jolloin solujen uskotaan jatkavan solusykliä mitoosin jälkeen.

Rintasyöpäkasvaimen korkealla Ki-67-indeksillä on todettu olevan negatiivinen vaikutus potilaan ennusteeseen (Brown ym., 1996; Rudolph ym., 1999). Toisaalta korkea Ki-67-indeksi kertoo rintasyöpäpotilaan hyötyvän solusalpaajahoidoista (Faneyte ym., 2003), mutta yhteyttä hormonihoidojen tehokkuuteen sillä ei ole todettu olevan (Chang ym., 2000).

1.3 ER:n, PR:n ja Ki-67:n määrittäminen rintasyöpäkudoksesta

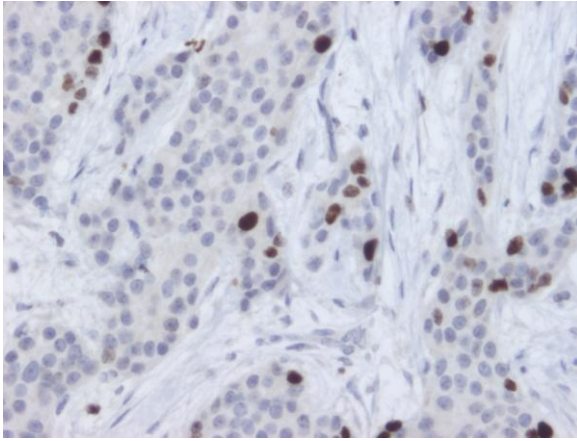
ER, PR ja Ki-67 määritetään rintasyöpänäytteistä nykyään pääasiassa immunohistokemiallisilla värjäyksillä (ks. yleiskatsaus Urruticoechea ym., 2005; yleiskatsaus Payne ym., 2008). Immunohistokemialliset menetelmät ovat korvanneet aikaisemmin suositut ER:n ja PR:n biokemialliset määrittämenetelmät yksinkertaisuutensa

ja nopeutensa vuoksi. Lisäksi immunohistokemiallisten värjäysten on todettu olevan ER:n ja PR:n määrittämisessä yhtä luotettavia tai jopa parempia menetelmiä kuin biokemialliset menetelmät (Barnes ym., 1996; Harvey ym., 1999; Zafrani ym., 2000).

Immunohistokemialliset värjäykset perustuvat antigeenit spesifisesti tunnistavien vasta-aineiden käyttöön. ER:n, PR:n ja Ki-67:n tunnistavat vasta-aineet toimivat aluksi lähinnä vain jäädytetyissä kudokseteissä (Greene ym., 1980; Gerdes ym., 1983; Press ja Green, 1988), kunnes kehitettiin myös fiksoiduissa ja parafiiniin valetuissa kudokseteissä toimivia vasta-aineita (Kubbutat ym., 1994; Barnes ym., 1996). Nykyään markkinoilla on kullekin antigeenille useita eri vasta-aineklooneja. Eri kloonit voivat tunnistaa antigeeneistä eri alueita, eli epitooppeja, mikä voi vaikuttaa niiden tarkkuuteen ja siten toimivuuteen värjäyksissä. Luotettavaksi todettuja vasta-aineklooneja ER:lle ovat esimerkiksi 6F11 (Novocastra) ja 1D5 (Dako), Ki-67:lle MIB-1 (Immunotech) ja MM-1 (Novocastra) sekä PR:lle PgR636 (Dako) (Lindboe ja Torp, 2002; Press ym., 2002; Kaplan ym., 2005).

Fiksoitujen ja parafiiniin valettujen rintasyövän kudokseteiden immunohistokemialliset määritykset vaativat usein kudokseteiden esikäsittelyn ennen värjäystä. Objektilasille leikatun leikkeen esikäsittely (yleensä kuumennuskäsittely alkalisessa pH:ssa) poistaa fiksaation aiheuttamia ristisidoksia soluista, jolloin vasta-aineet pääsevät vapaasti sitoutumaan antigeeneihin.

Vasta-aineiden sitoutuminen kudoksen antigeeneihin visualisoidaan immunohistokemiallisissa värjäyksissä kromogeenin, eli väriä tuottavan yhdisteen avulla. Yleisesti käytetty visualisointimenetelmä on entsyymaattinen, peroksidaasientsyymien toimintaan perustuva menetelmä. Tällöin yleisimmin käytetty kromogeeni on 3', 3'-diaminobentsidiini (DAB). Primaarivasta-aineen tunnistavaan sekundaarivasta-aineeseen liitetty piparjuuren peroksidaasientsyymi hajottaa DAB:in läsnä ollessa vetyperoksidin hapeksi ja vedeksi. DAB toimii reaktiossa elektronin luovuttajana, ja hapetettu DAB muodostaa reaktiopaikalle alkoholiin liukenemattoman ruskean sakan. Täten primaarivasta-aineen sitoutuminen antigeeniin havaitaan värjäyksissä ruskeana värinä. Näytteen tumat vastavärjätään hematoksyliinillä, jolloin negatiiviset tumat näkyvät värjäyksissä sinisen eri sävyinä (Kuva 2.).



Kuva 2. Rintasyövän kudoksenäytteen immunohistokemiallinen värjäys. Kuvassa on esitetty rintasyöpänäytteen kudoksenäytteen immunohistokemiallinen Ki-67-värjäys. Värjäyksessä kromogeeninä käytetyn DAB:in ansiosta Ki-67:n suhteen positiiviset tumat näkyvät kuvassa ruskeina. Negatiiviset tumat värjäytyvät sinisiksi vastavärjäyksessä, eli hematoksyliinivärjäyksessä.

1.4 Immunohistokemiallisesti värjättyjen näytteiden analysointi

Rintasyövän immunohistokemiallisia värjäyksiä pyritään tulkitsemaan mieluummin kvantitatiivisesti kuin kvalitatiivisesti. Värjäyksen kvantitatiivisessa analysoinnissa analysoidun antigeenin määrästä kudoksessa annetaan tarkka luku, kun kvalitatiivinen analysointi kertoo vain antigeenin positiivisuudesta tai negatiivisuudesta tarkasteltavassa näytteessä. Immunohistokemiallisten värjäysten kvantitatiivinen analysoiminen voi kuitenkin olla monimutkaista, sillä värjäyksen intensiteetti ei aina kerro antigeenin todellista pitoisuutta kudoksessa. Tämän takia esimerkiksi ER:n, PR:n ja Ki-67:n immunohistokemiallisten värjäysten tulkintoja pidetään ennemminkin semikvantitatiivisina, eli suuntaa antavina arvioina antigeenin määrästä tietyssä kudoksessa (Biesterfeld ym., 1998).

1.4.1 Näytteiden manuaalinen analysointi

Immunohistokemiallisesti värjättyjen rintasyöpänäytteiden manuaalinen analysointi tarkoittaa objektilasilla olevan kudoksenäytteen tarkastelua silmämääräisesti valomikroskoopin okulaarien läpi.

ER:n ja PR:n immunohistokemiallisten värjäysten analysointimenetelmiä on olemassa useita. Monet niistä luokittelevat rintasyöpänäytteet eri luokkiin pisteyttämällä ne positiivisten solujen prosenttiosuuden ja värjäytymisen intensiteetin mukaan. Kyseisiä menetelmiä ovat muun muassa H-pisteytys (Kinsel ym., 1989), Allredin pisteytys (Harvey

ym., 1999), Quickpisteytys (Reiner ym., 1990) ja Suomessakin yleisesti käytetty Histoscore (Jonat ym., 1986).

ER:n ja PR:n immunohistokemiallisten värjäysten kvantitatiivinen analysoiminen värjäyksen intensiteetin perusteella ei ole kuitenkaan yksinkertaista käytettäessä DAB:iä kromogeeninä (Umemura ym., 2004). DAB ei ole puhtaasti valoa absorboiva molekyyli vaan sitä hajottava. DAB:in absorptiospektrit vaihtelevat sen tummuuden mukaan, minkä vuoksi DAB ei noudata Lambert-Beerin lakia, jossa molekyylin absorbanssin ja konsentraation suhde on lineaarinen (van der Loos, 2008). Vaikka värjäyksen intensiteetin huomioivilla analyysimenetelmillä on saatu luotettavia tuloksia kliinisissä tutkimuksissa (Harvey ym., 1999), määrittävät monet laboratoriot näytteistä vain positiivisten solujen prosenttiosuuden tai luokittelevat näytteet kvalitatiivisesti pelkästään positiivisiksi tai negatiivisiksi. Myös nämä menetelmät on todettu luotettaviksi tarkasteltaessa potilaan soveltuvuutta hormonihoitoihin (Nadji ym., 2005; Horii ym., 2007; Turbin ym., 2008), joten selkeää linjaa näytteiden analysoinnissa ei ole.

Näytteen Ki-67-indeksi esitetään yleensä prosenttilukuna, joka kuvastaa jakautuvien solujen määrää syöpäsolukossa. Kudosnäytteen Ki-67-indeksi voidaan määrittää kahdella eri tavalla; laskemalla Ki-67-indeksi vain syöpäkudoksen nopeimmin jakautuvalta alueelta tai laskemalla näytteelle keskimääräinen Ki-67-indeksi ottamalla huomioon koko syöpäkudos (Wintzer ym., 1991). Immunohistokemiallisesti värjätyyn Ki-67:n analysoinnissa tulee ottaa huomioon värjäyksen intensiteetin vaihtelut solusyklin eri vaiheissa, sillä esimerkiksi heikosti värjäytyneet tumat kuuluvat yleensä lepovaiheen soluille tai soluille, jotka ovat siirtymässä solusyklistä lepovaiheeseen. Näitä ei tule siis ottaa mukaan analyysiin (du Manoir ym., 1991).

Immunohistokemiallisesti värjäytyjen kudosnäytteiden manuaalista analysointia on kyseenalaistettu varsinkin ER:n ja PR:n suhteen heikosti positiivisten näytteiden kohdalla. Ihmissilmä ei pysty erottamaan heikosti positiivisia näytteitä negatiivisista näytteistä samalla tarkkuudella päivästä toiseen, vaikka kyseessä olisinkin kokenut analysoija (Bejar ym., 1998). Kuten muutamissa tutkimuksissa on todettu, voimakkaasti positiivisten tai täysin negatiivisten näytteiden manuaalinen tulkinta on yksimielistä ja eri arvioitsijoiden väliset erot ovat pieniä (Rüdiger ym., 2002; Wells ym., 2004). Mutta heikosti positiivisten näytteiden, eli niin sanotusti rajatapauksien tulkinnoissa ilmenee selkeitä ongelmia (Wells

ym., 2004). Rüdiger ym. (2002) tekemän tutkimuksen mukaan 24 % 172 saksalaisesta patologista tulkitsi heikosti ER:n suhteen positiivisia rintasyöpänäytteitä virheellisesti negatiivisiksi. Ihmissilmän analyysikykyä pidetäänkin enemmän vertailevana kuin analyttisenä, joten immunohistokemiallisten värjäysten manuaalinen analysointi perustuu täysin subjektiivisten arvioiden varaan (Bernando ym., 2009).

1.4.2 Näytteiden tietokoneavusteinen analysointi

Immunohistokemiallisesti värjättyjen kudospäytteen tietokoneavusteisessa analyysissä kudospäyte kuvataan ensin valomikroskoopiin liitettävällä digitaalikameralla. Kyseisiä kuvia prosessoidaan tietokoneella tietyin matemaattisin toiminnoin, jonka päätteeksi saadaan näytteen tulos yleensä positiivisten solujen prosenttiosuutena tai tämä yhdistettynä värjäyksen intensiteettiin (Furukawa ym., 1998; Rexhepaj ym., 2008).

Tietokoneavusteisten analyysiohjelmien etuna manuaaliseen analysointiin verrattuna on pidetty ennen kaikkea ohjelmien objektiivisuutta; näytteet analysoidaan aina samalla tavalla ajasta ja paikasta riippumatta. Myös näytteiden analysointi tietokoneavusteisesti on nopeaa verrattuna manuaalisiin analyysihin (Lehr ym., 1997). Tietokoneavusteisten analyysiohjelmien objektiivisuus ja tarkkuus perustuvat muun muassa niiden kykyyn erottaa 256 eri värisävyä, ihmissilmän erotuskyvyn ollessa 64 (Bejar ym., 1998). Ne pystyvät vähentämään systemaattisesti tumien väreistä taustan vaikutuksen, mihin ihmissilmä ei tarkasti pysty. Täten ohjelmien analyysien toistettavuuteen eivät vaikuta esimerkiksi eri värjäyserien tai laboratorioiden välillä ilmenevät vaihtelut (Turbin ym., 2008).

Kuva-analyysiohjelmien tulee periaatteessa toimia kuin näytteitä manuaalisesti analysoiva ihminen; kuvista erotellaan ensin syöpäsolujen tumat ja näiden värjäytyvyyksien perusteella lasketaan näytteelle tulos (Sharangpani ym., 2007). Syöpäsolujen tumien tunnistamiseen tietokoneavusteiset analyysiohjelmat sisältävät tumien koon ja muodon tunnistavia menetelmiä, eli algoritmeja. Näiden algoritmien avulla ohjelmat erottelevat immunohistokemiallisesti värjättyistä rintasyövän kudospäytteenäytteistä syöpäsolujen tumat esimerkiksi epiteelisolujen tai sidekudoksen solujen joukosta (Kostopoulos ym., 2007; Sharangpani ym., 2007; Rexhepaj ym., 2008).

Syöpäsolujen tumien värjäytyvyksien tietokoneavusteisessa analysoinnissa on kyse eri väriaineiden värjäysintensiiteettien erottelusta. Tavoitteena on saada tietoa jokaisen yksittäisen väriaineen suhteellisesta osuudesta värjätyn kudoksen komponenteissa. Vaikka eri väriaineet silmämääräisesti näyttävätkin selkeästi erilaisilta, ovat niiden absorptiospektrit yleensä päällekkäisiä. Kuva-analyysin haasteena onkin jokaisen värin erottelu yksittäiseksi komponentiksi myös sellaisilta alueilta, joita on kaksi tai useampi väriaine värjännyt (Ruifrok ja Johnston, 2001).

Väriaineiden päällekkäisten absorptiospektrien ongelmaan on haettu ratkaisua eri tavoin; käyttämällä värjäyksissä monokromaattisia, yhden aallonpituuden väriaineita (Bacus ym., 1989), tietyille aallonpituudelle spesifisiä suodattimia (Zhou ym., 1992), puna-sini-vihreä (RGB)-kuviin pohjautuvia värien muunnostekniikoita (Lehr ym., 1999, Pham ym., 2007) tai värien erotteluun perustuvia algoritmeja (engl. color deconvolution algorithms) (Ruifrok ja Johnston, 2001).

Monokromaattisilla väriaineilla on saatu lupaavia tuloksia kuva-analyysin yhteydessä (Bacus ym., 1989), mutta kyseisten värien saatavuus ja siten käyttö histologisten näytteiden värjämisessä on hyvin rajoitettua (Ruifrok ja Johnston, 2001). Tiettyä valon aallonpituutta mittaavien suodattimien käyttökustannukset voivat taas olla korkeita, ja niitä käytettäessä edelleen ongelmana on värien absorptiospektrien osittainen päällekkäisyys (Zhou ym., 1992; Ruifrok ja Johnston, 2001).

RGB-kuviin perustuvat värien muunnostekniikat, kuten värien sävy-kylläisyys-intensiteetti (HSI)-muunnos tai syaani-magenta-keltainen-musta (CMYK) -muunnos, ovat toimineet lupaavasti immunohistokemiallisten värjäysten analysoinnissa (Lehr ym., 1999, Pham ym., 2007). Niitä on kuitenkin kritisoitu siitä, ettei kyseisten menetelmien avulla saada selville jokaisen yksittäisen värin osuutta lopullisessa näkyvässä värissä, jolloin usealla värillä värjäytynyt alue leimautuu käyttäjän asetuksista riippuen vain yhdeksi väriksi (Ruifrok ja Johnston, 2001). Värien dekonvoluutioon perustuvalla algoritmilla kyseistä ongelmaa ei ilmene ja sen on todettu analysoivan immunohistokemiallisia värjäyksiä paremmin kuin HSI-muunnokseen perustuvat algoritmit (Ruifrok ym., 2003). Värien dekonvoluutio perustuu alkuperäisen RGB-kuvan ortonormaaliseen muunnokseen käyttäjän antamien, väreistä riippuvien asetusten perusteella. Tällöin saadaan selvitettyä jokaisen kahden tai jopa kolmen värin vaikutus näkyvässä värissä (Ruifrok ja Johnston, 2001).

Tietokoneavusteista kuva-analyysiä käsittelevät oppikirjat painottavat käyttämään analyyseissä pelkästään häviöttömillä tallennusformaateilla tallennettuja kuvia, kuten esimerkiksi tif-tiedostoja (engl. Tagged Image File Format tai Tag Image File Format). Jpg-tiedostot (engl. Joint Photographic Experts Group) ovat taas kuvia, jotka on tallennettu häviöllisellä pakkauksella. Tällöin osa kuvien informaatiosta katoaa tallennuksen yhteydessä, minkä vuoksi jpg-tiedostojen käyttö kuva-analyysin yhteydessä ei ole ollut suositeltavaa.

1.4.2.1 Kuva-analyysiohjelmat

Tietokoneavusteiset kuva-analyysiohjelmat kehittyivät yhdessä immunohistokemiallisten värjäysten kanssa. Kehityksen alkupuolella, 1980-luvulla, ohjelmat olivat kuitenkin hyvin monimutkaisia ja laitteistot suuria, joten näytteet oli nopeampi analysoida manuaalisesti. Yleisen tekniikan kehittymisen mukana myös kuva-analyysiohjelmista on tullut yksinkertaisia sekä nopeita käyttää ja siten varteenotettavia analyysimenetelmiä laboratorioissa (Turbin ym., 2008). Kaupallisia tietokoneavusteisia analyysiohjelmia on käytetty tutkimustyössä jo 1980-luvun lopulta lähtien (Taulukko 1.).

Kaupallisten analyysiohjelmien käyttökustannukset voivat kuitenkin kasvaa liian suuriksi varsinkin pienille laboratorioille, mikä estää kuva-analyysiohjelmien hyödyntämistä laajalaisesti (Mofidi ym., 2003). Tämän vuoksi analyysiohjelmia on kehitetty muun muassa laajalti tunnetun ja edullisen kuvankäsittelyohjelman, Adobe Photoshop:in (Adobe Corporation), pohjalta (Lehr ym., 1997; Mofidi ym., 2003). Lisäksi rintasyöpänäytteiden immunohistokemiallisten värjäysten analysointiin ovat tutkimusryhmät itse kehittäneet algoritmeja, joiden käyttö on täysin riippumatonta kaikista kaupallisista kuva-analyysiohjelmista (Kostopoulos ym., 2007; Sharangpani ym., 2007; Rexhepaj ym., 2008).

Taulukko 1. Kaupallisia kuva-analyysiohjelmia. Kirjallisuudessa esiintyvillä kaupallisilla rintasyövän kudospäätteiden analysointiin tarkoitetuilla ohjelmilla on analysoitu immunohistokemiallisia ER-, PR- ja Ki-67-värjäyksiä jo 1980-luvun lopulta lähtien.

| Ohjelma | Analysoitu | Lähde |
|--|---------------|--|
| ACIS (ChromaVision) | ER | Gokhale ym., 2007 |
| ACIS III Image Analyzer (Dako) | ER,PR | Hanley ym., 2009 |
| analySIS 3.0 (Olympus) | ER,PR | Markiewicz ym., 2009 |
| Ariol SL-50 (Applied Imaging) | ER,PR | Gokhale y., 2007; Turbin ym., 2008; Faratian ym., 2009 |
| CAS 100 (Lombard) | ER | McClelland ym., 1990 |
| CAS 200 (Lombard/Becton Dickinson) | ER,PR,Ki-67 | Cavaliere ym., 1996; Layfield ym., 1996; Querzoli ym., 1996; Furukawa ym., 1998; Castagnetta ym., 1999, Abboud ym., 2008 |
| CM-2 (Hund Wetzlar) | Ki-67, ER, PR | Biesterfeld ym., 1998 |
| QCA (Cell Analysis Inc.) | ER | Diaz ym., 2004 |
| Quantimet 720 Image Analysis System (IMANCO) | ER | Sklarew ym., 1989 |
| SAMBA 200 | ER, PR,Ki-67 | Charpin ym., 1988 a,b,c |
| SAMBA 2050 (TRIBVN) | ER,PR | Charpin ym., 2009 |
| Wscannary Image Analyzer (Galai Corporation) | ER | Bejar ym., 1998 |

Sekä kaupallisten että itse kehitettyjen analyysiohjelmien luotettavuutta on testattu vertailemalla niillä analysoituja tuloksia samojen näytteiden biokemiallisesti määritettyihin (Cavaliere ym., 1996; Layfield ym., 1996) tai manuaalisesti analysoituihin tuloksiin (Gokhale ym., 2007; Sharangpani ym., 2007). Vertailujen perusteella analyysiohjelmat ovat poikkeuksetta toimineet biokemiallisten määritysten ja manuaalisen analysoinnin tarkkuudella tai jopa niitä paremmin. Analyysiohjelmien objektiivisuus on todettu suureksi eduksi varsinkin heikosti positiivisten näytteiden analysoinnissa (Rexhepaj ym., 2008). Tietokoneavusteisilla kuva-analyysiohjelmilla analysoidut tulokset ovat myös tutkitusti korreloineet hyvin potilaan eloonjäämisennusteen ja hoidoista hyötymisen kanssa (Turbin ym., 2008). Kuva-analyysiohjelmia on käytetty myös apuvälineenä rintasyövän tutkimustyössä (Abboud ym., 2008; Hanley ym., 2009).

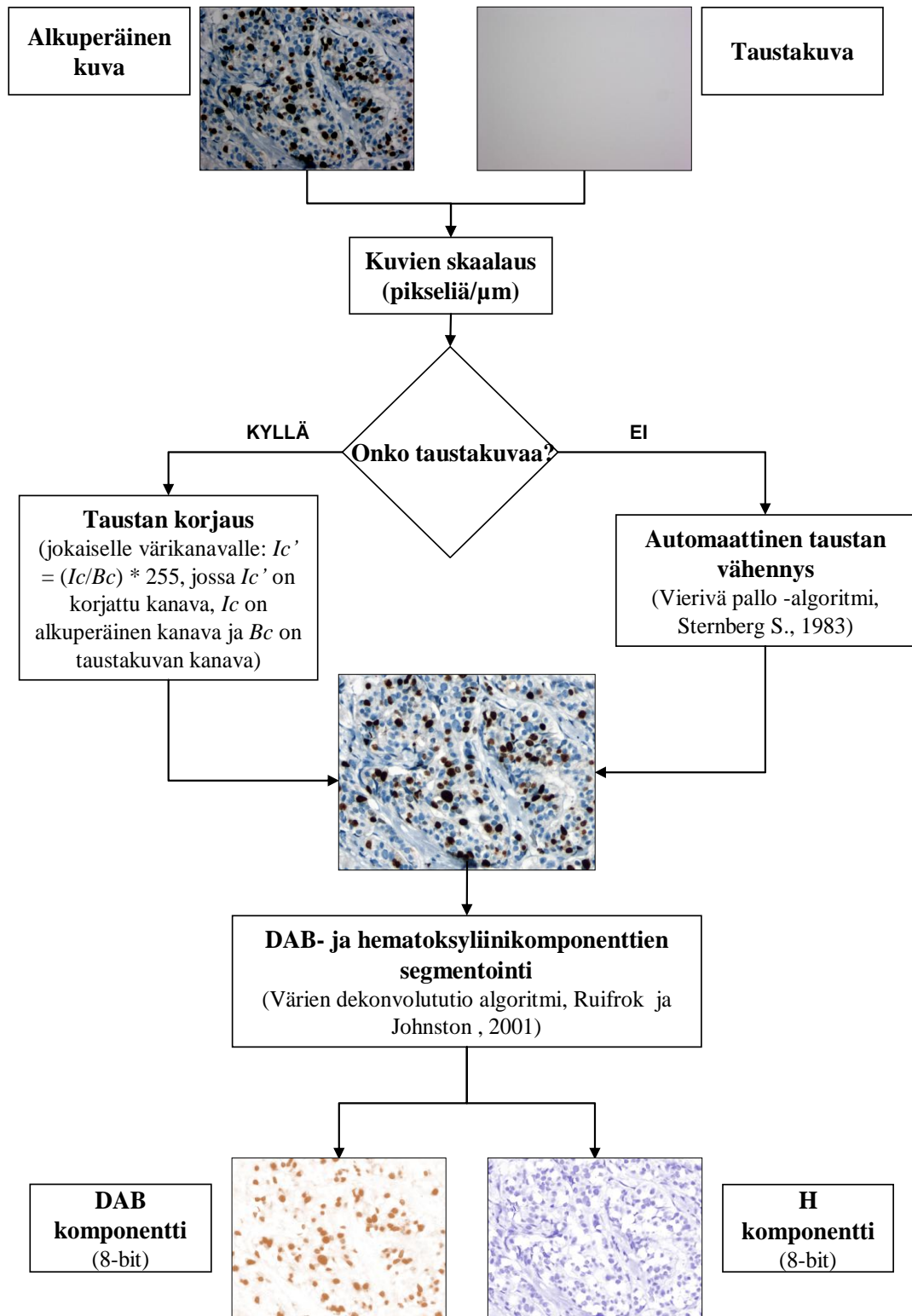
Tietokoneavusteisia kuva-analyysiohjelmia ei voida pitää täysin automaattisina järjestelminä, sillä ne vaativat kokeneen käyttäjän valitsemaan kudospäätteestä analysoivat alueet (Diaz ym., 2004; Turbin ym., 2008). Esimerkiksi Ariol SL-50 – ohjelma (Applied

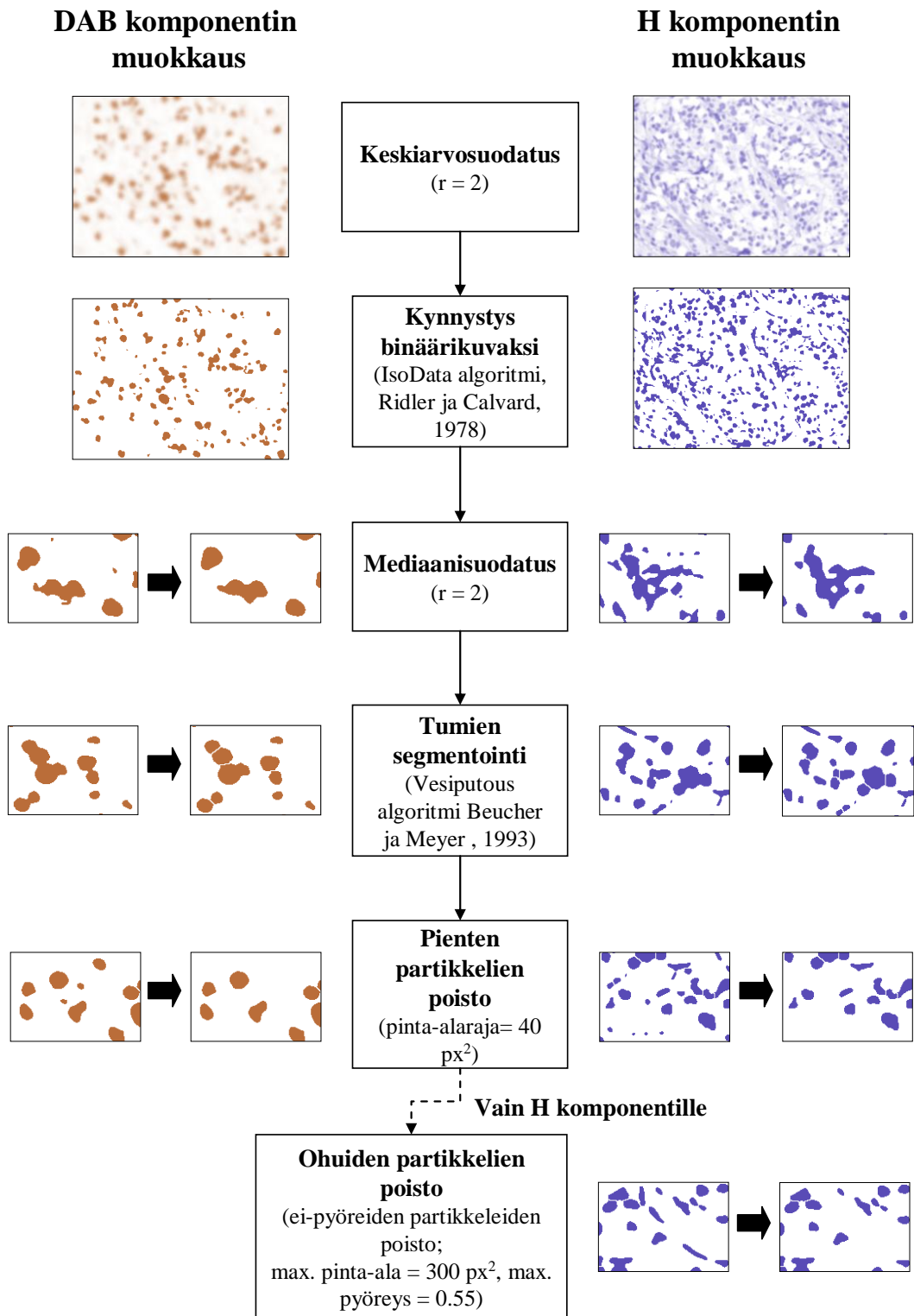
Imaging) pystyy valitsemaan analysoitavat alueet myös itse, mutta tällä toiminnolla ei ole vielä saatu luotettavia tuloksia (Gokhale ym., 2007). Lisäksi osa analyysiohjelmista vaatii ohjelman kalibrointia tai opetusta ennen varsinaista analysointia, minkä jälkeen ne kuitenkin kykenevät analysoimaan näytteet itsenäisesti (Gokhale ym., 2007; Faratian ym., 2009).

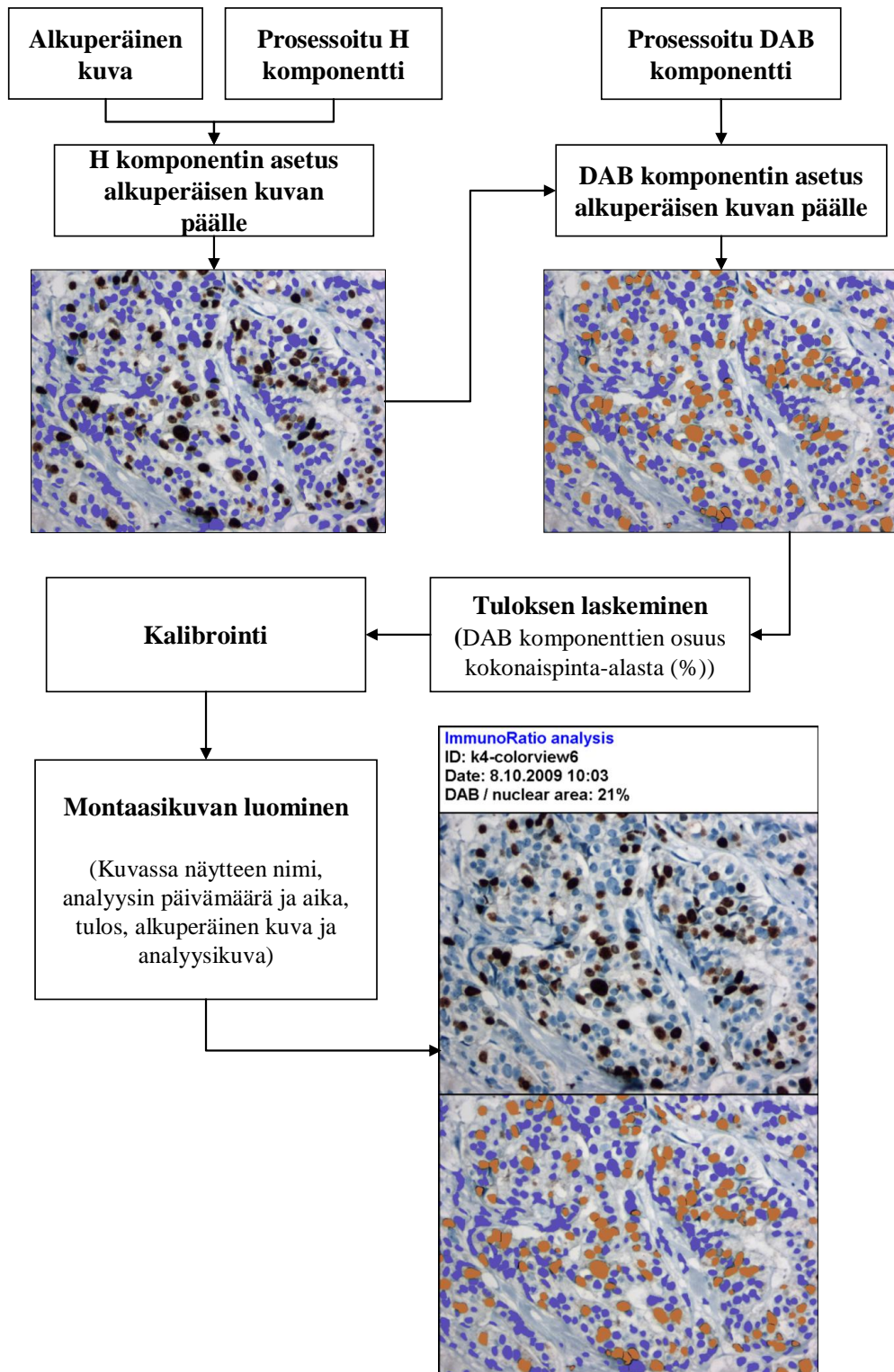
1.4.2.2 ImmunoRatio

Tutkimuksessa käytetty kuva-analyysiohjelma, ImmunoRatio, on kehitetty Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian Instituutissa, professori Jorma Isolan tutkimusryhmässä. Sen kehityksessä ovat olleet mukana DI Arttu Viitanen, FM Vilppu Tuominen sekä prof. Jorma Isola. ImmunoRatio:n ohjelmointialustana toimii kuvankäsittelyohjelma ImageJ (Rasband, 1997–2009).

ImmunoRatio:lla analysoiminen vaatii valomikroskoopin ja siihen liitettävän digitaalimikroskooppikameran tai virtuaalimikroskopialaitteiston käyttöä. Analyysiohjelman toimintaperiaate on esitetty Kuvassa 3.







Kuva 3. ImmunoRatio:n toimintaperiaate. Kuva muokattu Vilppu Tuomisen alkuperäisestä versiosta.

ImmunoRatio:ta käytettäessä on näytteestä otetun kuvan lisäksi suositeltavaa ottaa myös taustakuva näytelasilta kudisleikkeen ulkopuolelta. Taustakuvalla tasapainotetaan mikroskoopin ja siten näytteestä otetun kuvan valotuksen vaihteluja. Myös kuvien skaalan määrittäminen on tärkeää, eli kuinka monta pikseliä kuvassa on mikrometrin pituisella matkalla. Tämä vaikuttaa esimerkiksi kuvista myöhemmin poistettavien pienten ja litteiden, syöpäsolukoon kuulumattomien komponenttien määrittämiseen.

Immunohistokemiallisesti värjättyjen rintasyöpänäytteiden analysointi ImmunoRatio:lla perustuu Ruifrok ym., 2001 esittelemään RGB-kuviin pohjautuvaan värien dekonvoluutio-algoritmiin (engl. color deconvolution). Kyseinen algoritmi erottelee tavallisen valomikroskooppiin liitettävän digitaalikameran ottamasta kuvasta kunkin värin osuudet omiksi kuvikseen. Edellytyksenä tarkoille analyyseille on, että käytettyjen väriaineiden (kuten DAB ja hematoksyliini) punaisen, sinisen ja vihreän värin absorptiot eroavat riittävästi toisistaan. Tumien segmentointivaiheessa ohjelma laskee kunkin värin (punainen, vihreä ja sininen) intensiteetin jokaista kuvan pikseliä kohti ja saatujen arvojen avulla määrittää kunkin värin optisen tiheyden. Tämän avulla voidaan määrittää jokaisen käytetyn väriaineen vaikutus tiettyä pikseliä kohti. Saadulle RGB-värimalliin perustuvalla tiedolla suoritetaan vielä ortonormaalinen transformaatio, jotta kunkin väriaineen vaikutus näkyvässä värissä saataisiin selville. Ohjelman avulla on siis mahdollista määrittää väriaineiden pitoisuuksien suhteet lopullisessa näkyvässä värissä, vaikka värit olisivatkin keskittyneet tietylle alueelle ja niiden absorptiospektrit olisivat päällekkäisiä. Jokaiselle väriaineelle voidaan luoda erillinen kuva värjätystä näytteestä, kuten Kuvassa 3. (Ruifrok ja Johnston, 2001).

Värien segmentoinnin jälkeen sekä DAB komponenteista (ruskea) että hematoksyliini (H) komponenteista (sininen) koostuvia kuvia muokataan ennen tuloksen laskemista. Keskiarvosuodatuksella poistetaan kuvista tausta eli epäspesifisesti värjättyneitä alueita (Kuva 3.). Prosessissa ohjelma laskee jokaiselle kuvan pikselille värisävykeskiarvon sen naapuruston perusteella (säde kaksi pikseliä). Tämän tarkoituksena on tuottaa seuraavan vaiheen kynnistyksessä tasainen kuva. Kynnistyksessä edellisestä kuvasta muodostetaan binäärikuva (Kuva 3.). Binäärikuvulle suoritetaan mediaanisuoitus, jossa jokaiselle pikselille lasketaan värisävyn mediaaniarvo sen naapuruston perusteella (säteenä edelleen kaksi pikseliä) (Kuva 3.). Mediaanisuoituksella saadaan binäärikuvan tumien reunoista pyöreitä ja tasaisia. Mediaanisuoituksen jälkeen tumat segmentoidaan vielä yksittäisiksi

komponenteiksi niin sanotulla vedenjakaja-algoritmillä (engl. watershed algorithm) (Kuva 3.).

Ennen näytteen tuloksen määrittämistä, ohjelma asettaa prosessoidut DAB- ja H-komponenteista koostuvat kuvat alkuperäisen kuvan päälle (Kuva 3.). Tuloksen määrittäminen tapahtuu selvittämällä positiivisten tumien pinta-alan (= DAB komponentit) osuus tumien yhteisestä pinta-alasta (= DAB + H komponentit). Pinta-alat määritetään neliöpikseleinä ja lopullinen tulos esitetään prosenttiyksikköinä. Varsinaisessa tuloskuvassa (Kuva 3.) näkyy käyttäjän määrittelemä näytteen nimi, analyysin päivämäärä ja aika sekä näytteen tulos prosentteina. Lisäksi tuloskuvassa on esitetty sekä alkuperäinen kuva että siitä muodostettu analyysikuva.

ImmunoRatio:n voi halutessaan kalibroida ennen varsinaista analysointia. Kalibroinnin tarkoituksena on saada ImmunoRatio:n tulokset vastaamaan mahdollisimman tarkasti näytteiden manuaalisesti määritettyjä tuloksia. Kalibroinnissa määritetään ImmunoRatio:n kalibraatiokertoimet, jotka saadaan analysoimalla immunohistokemiallisesti värjättyistä näytteistä otettuja kuvia sekä manuaalisesti että kalibroimattomalla ImmunoRatio:lla. Manuaalisesti ja kalibroimattomalla ImmunoRatio:lla määritettyjä tuloksia verrataan toisiinsa epälineaarilla regressioanalyysillä, jossa suoran sovitus tapahtuu kolmannen asteen yhtälön mukaisesti. Suoran sovittaneen yhtälön kulmakertoimet ovat ImmunoRatio:n kalibroitinkertoimet, jotka syötetään ohjelman tietoihin. Kalibrointi suoritetaan vain kerran, minkä jälkeen kertoimia ei tarvitse enää muuttaa.

ImmunoRatio toimii osoitteessa <http://imtmicroscope.uta.fi/immunoratioweb/> ja se julkistetaan yleiseen käyttöön vuoden 2010 alkupuolella.

1.4.2.3 Virtuaalimikroskopia

Immunohistokemiallisesti värjättyjä kudoksenäytteitä voidaan perinteisen valomikroskoopin lisäksi tarkastella myös virtuaalimikroskopiaa hyödyntäen. Virtuaalimikroskopiassa objektilasilla oleva kudoksenleike kuvataan kokonaisuudessaan, eli skannataan pienellä suurennoksella tietokoneelle. Näytettä, eli virtuaalinäytelasia voidaan siten tarkastella tietokoneen ruudulta eri suurennoksilla, samaan tapaan kuin kudoksenäytettä mikroskoopin okulaarien läpi. Nykyään markkinoilla on monia näytteiden skannaamiseen tarkoitettuja virtuaalimikroskopia-laitteistoja (Rojo ym., 2006).

Virtuaalimikroskopian etuna on ennen kaikkea nopea tiedonsiirto esimerkiksi eri patologioiden välillä. Menetelmän avulla näytteläseja ei tarvitse enää fyysisesti lähettää paikasta toiseen, vaan kudoksenäytteistä otettuja digitaalikuviakin voidaan tarkastella esimerkiksi internetin kautta paikasta ja ajasta riippumatta (Lundin ym., 2004). Lisäksi virtuaalimikroskopian avulla vältetään kudoksenäytteille ajan myötä tapahtuvat laadun heikkenemiseen liittyvät ongelmat, kuten värjäyksen haaleneminen sekä lasien ja siten koko näytteen särkyminen. Virtuaalimikroskopia on todettu myös hyödylliseksi apuvälineeksi opetuksessa (Leong ja McGee, 2001).

1.4.3 Raja-arvot

Rintasyöpänsäytteiden luokittelu ER:n tai PR:n suhteen positiiviseksi ja negatiiviseksi manuaalisesti tai tietokoneavusteisesti analysoidun tuloksen perusteella ei ole yksinkertaista. Eri laboratorioissa raja-arvot positiivisten ja negatiivisten näytteiden välillä voivat vaihdella jopa 0,1 %:n ja 20 %:n välillä (Layfield ym., 2000; Rhodes ym., 2000). Raja-arvoilla voidaan arvioida joko potilaan soveltuvuutta hormonihoidoihin (prediktiivinen raja) tai eloonjäämisennustetta (prognostinen raja) ja ne voivat erota toisistaan (Jalava ym., 2005).

Yleisesti eri tutkimuksissa luotettavaksi todettu prediktiivinen raja ER:n suhteen positiivisten ja negatiivisten näytteiden välillä on 10 % (Pertschuk ym., 1985; Fernö ym., 1996; Ogawa ym., 2004; Stendahl ym., 2006; Yamashita ym., 2006; Horii ym., 2007), joka pätee muutamien tutkimusten mukaan myös PR:lle (Ogawa ym., 2004; Yamashita ym., 2006). Muita tutkittuja prediktiivisiä raja-arvoja ER:lle ovat muun muassa 1 % (Harvey ym., 1999, Viale ym., 2007), 7 % (Rexhepaj ym., 2008) ja 20 % (Jalava ym., 2005) sekä PR:lle 1 % (Mohsin ym., 2004; Viale ym., 2007), 5 % (Rexhepaj ym., 2008) ja 74 % (Stendahl ym., 2006). Osalla edellä mainituista raja-arvoista on todettu olevan myös prognostista arvoa (Mohsin ym., 2004; Horii ym., 2007).

Myös Ki-67-värjäyksen raja-arvoissa on vaihtelua. Ki-67-värjäyksen analysoinnissa näytteet yleensä luokitellaan hitaasti tai nopeasti jakautuviin syöpäkasvaimiin, mikä taas vaikuttaa potilaan ennusteeseen (Viale ym., 2008). Raja-arvoina käytetään esimerkiksi mielivaltaisesti valittuja raja-arvoja, kuten 10 % tai 20 %, tai tietyssä tutkimuksessa määritettyä mediaaniarvoa (Molino ym., 1997). Taulukossa 2. on esitetty kirjallisuudessa

esitettyjä raja-arvoja Ki-67-värjäykselle. Kyseisillä raja-arvoilla on esitettyjen tutkimusten mukaan prognostista arvoa.

Taulukko 2. Ki-67:n raja-arvoja. Kirjallisuudessa esitettyjä raja-arvoja hitaasti ja nopeasti jakautuville syöpäkasvaimille Ki-67-värjäyksen perusteella.

| Lähde | Ki-67 raja-arvo (%) | Vasta-aine | Seuranta, kk (mediaani) | Potilaiden lukumäärä |
|-----------------------|---------------------|------------|-------------------------|----------------------|
| Haerslev ym., 1996 | 1 | MIB-1 | >120 (keskiarvo) | 487 |
| Jacquemier ym., 1998 | 3,5 | MIB-1 | 60 | 162 |
| Brown ym., 1996 | 5 | Ki-67 | 72 | 674 |
| Jansen ym., 1998 | 7 | MIB-1 | 128 | 341 |
| Gasparini ym., 1992 | 7,5 | Ki-67 | 36 | 164 |
| Pierga ym., 1996 | 8 | Ki-67 | 70 | 140 |
| Domagala ym., 1996 | 10 | MIB-1 | 88 (keskiarvo) | 116 |
| Erdem ym., 2005 | 10 | MM1 | 72,5 | 47 |
| Iacopetta ym., 1998 | 10 | MIB-1 | 74 | 422 |
| Marrelli ym., 2006 | 10 | MIB-1 | - | 675 |
| Seshardi ym., 1996 | 10 | MIB-1 | 66 | 707 |
| Viale ym., 2008 | 11 | MIB-1 | - | 2749 |
| Neri ym., 2008 | 15 | MIB-1 | 66 | 432 |
| Wintzer ym., 1991 | 16 | Ki-67 | 37 | 63 |
| Pinder ym., 1995 | 17 | MIB-1 | - | 177 |
| Liu ym., 2001 | 17,8 | MIB-1 | 187,2 | 791 |
| Clahsen ym., 1999 | 20 | MIB-1 | 41 | 441 |
| Pellikäinen ym., 2003 | 20 | MIB-1 | 57,3 | 414 |
| Wiesner ym., 2009 | 20 | MIB-1 | 56,4 | 1232 |
| Dettmar ym., 1997 | 25 | MIB-1 | 37,5 | 90 |
| Rudolph ym., 1999 | 25 | Ki-S5 | 99 | 371 |
| Spyratos ym., 2002 | 25 | MIB-1 | - | 185 |
| Thor ym., 1999 | 28,6 | MIB-1 | 63 | 486 |
| Caly ym., 2004 | 32,4 | MIB-1 | 72 (minimi) | 244 |

On myös esitetty, ettei yhden raja-arvon määrittäminen Ki-67-värjäykselle ole välttämättä mahdollista. Esimerkiksi Pinder ym., 1995, osoittivat kolmen eri luokitteluasteen sopivan Ki-67-värjäyksen analysointiin; < 17 %, 17 % - 34 % ja > 34 % positiivisia soluja. Myös Molino ym., 1997 totesivat yhden raja-arvon määrittämisen olevan mahdotonta ja jopa tarpeetonta.

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksessa oli tarkoituksena validoida tietokoneavusteinen kuva-analyysiohjelma, ImmunoRatio, rintasyövän kliiniseen diagnostiikkaan. Työssä keskityttiin seuraaviin seikkoihin:

1. Rintasyöpänäytteiden immunohistokemiallisten värjäysten manuaalisen tarkastelun ja tietokoneavusteisen analyysin vertailu.
2. Näytteiden värjäyskertojen ja tietokoneavusteisten analyysikertojen toistettavuuksien selvittäminen – kumman vaihtelu on merkittävämpää?
3. Rintasyöpänäytteiden immunohistokemiallisten värjäysten merkitys ImmunoRatio:n analyysissä.
 - Miten käytettävän vasta-aineen ja hematoksyliinin pitoisuuksien tai vaikutusaikojen muutokset vaikuttavat ImmunoRatio:n analyysiin?
4. Immunohistokemiallisesti värjättyjen näytteiden kuvausteknisten seikkojen merkitys ImmunoRatio:n analyysissä.
 - Kuinka monta näkökenttää on näytteestä kuvattava, jotta näytteen tulos olisi luotettava?
 - Onko mikroskoopin valotuksella tai käytettävällä objektiivilla merkitystä ImmunoRatio:n analyysiä ajatellen?
 - Voiko ImmunoRatio:lla analysoida myös häviöllisellä pakkauksella (jpg) tallennettuja kuvia?
 - Miten eri mikroskooppikamerat ja virtuaalimikroskopia-laitteistot soveltuvat ImmunoRatio:n kanssa käytettäväksi?
 - Onko kuvista tarpeellista rajata pois syöpäsolukkaan kuulumattomia komponentteja?
5. ImmunoRatio:n käyttö rintasyövän tutkimuksessa
 - Ki-67-värjäyksen optimaaliset raja-arvot
 - ER:n, PR:n ja Ki-67:n ilmenemisien heterogeenisyys
 - ER-, PR- ja Ki-67-statukset primaarikasvaimessa ja uusiutuneessa kasvaimessa, eli residiivikasvaimessa

3. Materiaalit ja menetelmät

Tutkimuksen käytännön osuus suoritettiin Seinäjoen keskussairaalan patologian osastolla huhti-syyskuussa 2009. Lisäksi muutamia laboratoriokokeita suoritettiin myös Tampereen yliopiston Lääketieteellisen Teknologian Instituutissa (IMT) syöpäbiologian tutkimusryhmässä. Koska työn aiheena oli menetelmän validointi, ei tutkimuksen suorittamiseen tarvittu eettisen lautakunnan lupaa. Tutkimuksesta jäi tekemättä Ki-67:n raja-arvojen määrittäminen ajanpuutteen sekä vajaan näytemateriaalin vuoksi. Työssä edettiin Kuvan 4. mukaisesti.



Kuva 4. Tutkimuksen eteneminen. Työ aloitettiin rintasyöpänäytteiden valitsemisella ja värjämisellä. ImmunoRatio:n validointi sisälsi ohjelman kalibroinnin ja testauksen sekä värjäys- ja kuvausteknisten seikkojen selvittämisen. ImmunoRatio:ta käytettiin myös rintasyövän tutkimustyössä.

3.1 Näytteiden valinta

Tutkimuksessa oli mukana 126 rintasyöpäpotilaasta leikattua, formaliinifiksoitua ja parafiiniin valettua rintasyövän kudoksenäytettä Seinäjoen keskussairaala (Taulukko 3.). Mukana olleet rintasyöpänäytteet valittiin QPati-tietokannasta, pääasiassa vuodelta 2008. Näytteet valittiin järjestyksessä vuoden 2008 lopusta vuoden alkuun päin. Tutkimukseen valittiin näytteitä, jotka edustivat invasiivista rintasyöpäsolukkoa ja siten tutkimukseen ei valittu rintasyöpiä, joiden diagnoosi oli carcinoma in situ. Tutkimukseen ei myöskään valittu näytteitä, jotka olivat ohut- tai paksuneulanäytteitä. Osa primaari- ja residivikasvaimista valittiin vuosilta 1988 – 2007. Primaari- ja residivikasvainten valinnassa kasvaimien piti olla peräisin samasta rinnasta ja leikkauksien väli sai olla vähintään vuosi.

Näytteiden valinnan jälkeen niille annettiin näytenumerot (1 – 126), joilla niitä käsiteltiin tutkimuksen aikana. Tutkimuksessa käytettiin myös 25 Tampereen IMT:n rintasyövän kudoksenäytettä. Nämä näytteet eivät ole mukana Taulukossa 3.

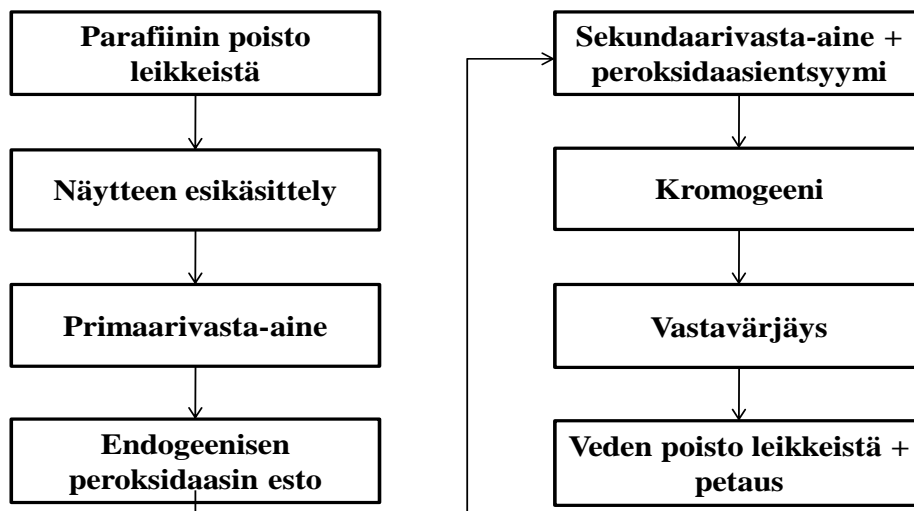
Taulukko 3. Tutkimuksen materiaali. Tutkimuksen Seinäjoen keskussairaalan näytteiden kliiniset tiedot.

| | Näytteiden lukumäärä | | Näytteiden lukumäärä |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Potilaan ikä | | ER status | |
| < 60-vuotta | 55 | Positiivinen | 109 |
| ≥ 60-vuotta | 71 | Negatiivinen | 12 |
| Kasvaimen koko | | Ei tiedossa | 5 |
| < 2,0 cm | 49 | PR status | |
| ≥ 2,0 cm | 72 | Positiivinen | 89 |
| ei tiedossa | 5 | Negatiivinen | 33 |
| Gradus | | Ei tiedossa | 4 |
| I | 4 | Ki-67 indeksi | |
| II | 75 | alle 5 % | 21 |
| III | 33 | 5 - 10 % | 25 |
| ei tiedossa | 14 | 10 - 30 % | 29 |
| Histologinen tyyppi | | yli 30 % | 46 |
| Duktaalinen | 88 | Ei tiedossa | 5 |
| Lobulaarinen | 20 | HER2 status | |
| Duktolobulaarinen | 11 | Positiivinen | 14 |
| Muut | 7 | Negatiivinen | 98 |
| Imusolmukestatus | | Ei tiedossa | 14 |
| Positiivinen | 52 | | |
| Negatiivinen | 61 | | |
| ei tiedossa | 13 | | |

3.2 Näytteiden valmistus

Valituista näytteistä leikattiin rotaatiomikrotomilla kolmen mikrometrin paksuisia peräkkäisiä leikkeitä Superfrost Plus – objektilaseille. Leikkeiden annettiin kuivua ja kiinnittyä laselle lämpölevyllä (+57 °C) vähintään 16 tuntia. Näytteiden leikkauksen suorittivat Seinäjoen keskussairaalan patologian osaston laboratoriohoitajat Ritva Kujala, Pirjo Pekkala ja Helvi Salmela.

Näytteiden värjäykset suoritettiin koneellisesti värjäysautomaateilla. Sekä Seinäjoella että Tampereella näytteet värjättiin kunkin laboratorion rutiinivärjäysten mukaan. Kuvassa 5. on esitetty värjäyksien tärkeimmät vaiheet ja Taulukkoon 4. on koottu värjäysautomaatit ja niissä käytetyt reagenssit. Leikkeistä poistettiin parafiini ennen värjäystä joko laskevassa ksyleeni-alkoholisarjassa (Seinäjoki) tai laskevassa n-heksaani-alkoholisarjassa (Tampere). Värjäysten jälkeen leikkeistä poistettiin vesi joko nousevassa alkoholi-ksyleenisarjassa (Seinäjoki) tai nousevassa alkoholi-ksyleenin korvikesarjassa (Tampere).



Kuva 5. Näytteiden värjäysprotokolla yksinkertaistettuna.

Taulukko 4. Värjäysautomaatit. Värjäyksissä käytetyt värjäysautomaatit, näytteiden esikäsittelyt, automaattien reagenssit ja niiden vaikutusajat Tampereella sekä Seinäjoella. Laitekohtaiset esikäsittelyt olivat kaikille vasta-aineille samat. Kitteihin kuuluvia reagensseja ei ole eritelty.

| | Tampere | Seinäjoki | Seinäjoki |
|---|--|--|--|
| Värjäysautomaatti | Autostainer (LabVision) | Bond Max (Leica Microsystems) | Benchmark XT (Ventana Medical Systems) |
| Esikäsittely | TE-puskuri, pH 9, 95°C, 15 min (PT Module, LabVision) | Epitope retrieval solution 2, 100°C, 40 min (Bond Max, Leica Microsystems) | CC1 standard, + 95°C - 100°C, 30 min (Benchmark XT, Ventana Medical Systems) |
| ER-vasta-aine | | | |
| Klooni | 6F11 | 6F11 | - |
| Laimennos | 1:600 | 1:300 | - |
| Valmistaja | Novocastra | Novocastra | - |
| Vaikutusaika | 30 min | 60 min | - |
| PR-vasta-aine | | | |
| Klooni | - | PgR 636 | - |
| Laimennos | - | 1:600 | - |
| Valmistaja | - | Dako | - |
| Vaikutusaika | - | 60 min | - |
| Ki-67 -vasta-aine | | | |
| Klooni | MM1 / MIB-1 | MM1 | MIB-1 |
| Laimennos | 1:500 / 1:300 | 1:100 | 1:100 |
| Valmistaja | Novocastra / Dako | Novocastra | Dako |
| Vaikutusaika | 30 min | 60 min | 32 min |
| Endogeenisen peroksidaasin esto | Post-blocking solution (PowerVision+ Kit, Immunovision) | Bond Refine Detection Kit (Vision BioSystems Limited) | Peroxidase-Blocking Solution (Dako) |
| Vaikutusaika | 20 min | 5 min | 8 min |
| Polymeeri + sekundaarivasta-aine | Poly-HRP anti-Mouse/Rabbit IgG (PowerVision + Kit, ImmunoVision) | Bond Refine Detection Kit (Vision BioSystems Limited) | <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems) |
| Vaikutusaika | 30 min | 12 min | 8 min |
| Kromogeeni | ImmPACT DAB (Vector Laboratories) | Bond Refine Detection Kit (Vision BioSystems Limited) | <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems) |
| Vaikutusaika | 5 min | 10 min | 8 min |
| Vastavärjäys | Mayerin hematoksyliini (Oy FF-Chemicals Ab) | Hematoksyliini (Dako) | Hematoxylin I ja II (Ventana Medical Systems) |
| Vaikutusaika | 2 min | 1 min | 4 - 32 min |

Värjäykset suoritettiin Seinäjoella Bond Max (Leica Microsystems)– laitteella ellei toisin ole mainittu. Kaikissa värjäyksissä oli mukana kontrolleina Tampereella IMT:ssä viljeltyjä

MCF-7 soluja. MCF-7-soluissa ER:n konsentraatio tumassa on noin 500 – 2500 fmol/mg ja PR:n 70 – 300 fmol/mg solulimassa (Horwitz ym., 1978 b).

ImmunoRatio:n kalibrointi ja testaus. Sekä kalibroinnissa että testauksessa oli mukana 50 näytettä. Kokeissa käytettiin kyseisten näytteiden vuonna 2008 Seinäjoen keskussairaalan patologian osastolla rutiinissa rintasyöpädiagnostiikassa värjättyjä leikkeitä. Kummassakin kokeessa oli 25 näytteestä värjätty Ki-67, 13 näytteestä PR ja 12 näytteestä ER. Näytteet edustivat tasaisesti skaalaa 0 – 100 % positiivisia soluja. ImmunoRatio:n toistettavuutta tutkittiin edellisistä näytteistä kolmella näytteellä, joista kahdesta oli värjätty ER ja yhdestä Ki-67. Värjäykset oli tehty Bond Max – laitteella Kuvan 5. ja Taulukon 4. mukaisesti.

Värjäystekniset seikat. Kahden värjäysautomaatin toistettavuuksien tutkimista varten värjättiin sekä Seinäjoella että Tampereella samasta näytteestä viisi peräkkäistä leikettä eri värjäyskerroilla. Mukana oli yhteensä 20 näytettä, joista kaikista värjättiin Ki-67. Näistä kymmenen näytettä oli ER:n suhteen positiivisia ja näistä värjättiin myös ER. Samoilla näytteillä tutkittiin myös kahden laboratorion välistä vaihtelua ER- ja Ki-67 – värjäyksissä.

Värjäysten optimointia varten värjättiin Seinäjoella isojen rintasyöpäkasvaimien leikkeitä Ki-67 – vasta-aineen (MM1, Novocastra) eri laimennoksilla; 1:10, 1:25, 1:100, 1:400 ja 1:1000. Kokeessa oli mukana yhteensä 10 näytettä, joissa syöpäkasvaimen halkaisija oli vähintään 2,0 cm. Ki-67:n kahden eri vasta-ainekloonin (MM1, Novocastra ja MIB-1, Dako) vertailua varten oli Tampereella IMT:ssä värjätty 20 rinnakkaisesta rintasyöpänäytteestä Ki-67 molemmilla klooneilla. Värjäykset oli optimoitu molemmille vasta-aineen klooneille erikseen.

Kuuden edellä mainitun ison syöpäkudoksenäytteen peräkkäisiä leikkeitä värjättiin myös hematoksyliinin eri pitoisuuksilla tai vaikutusajoilla. Näistä näytteistä kolme värjättiin Seinäjoella ja kolme Tampereella. Kokeessa värjättiin heikko, optimaalinen ja liian tumma vastavärjäys Ki-67 – värjäykselle. Seinäjoella värjäykset tehtiin Ventanan BenchMark XT – laitteella (Taulukko 4.) ja värjäyksissä käytettiin Ventanan Hematoxylin I:stä 16 minuutin vaikutusajalla (tumma vastavärjäys) ja Hematoxylin II:sta kahdella eri vaikutusajalla; neljä minuuttia ja 32 minuuttia (heikko ja optimaalinen vastavärjäys). Tampereella vastaavissa värjäyksissä käytettiin Mayerin hematoksyliiniä (Taulukko 4). Optimaalisessa vastavärjäyksessä hematoksyliiniä käytettiin laimentamattomana kahden minuutin vaikutusajalla. Laimeassa vastavärjäyksessä hematoksyliiniä laimennettiin 1:10

vaikutusajan ollessa kaksi minuuttia. Liian tumma vastavärjäys saatiin käyttämällä laimentamatonta hematoksyliiniä 10 minuutin vaikutusajalla.

Kuvaustekniset seikat. Näytteestä kuvattavien näkökenttien lukumäärän selvittämisessä käytettiin kymmentä isoa rintasyöpäkasvainta (halkaisija $\geq 2,0$ cm), jotka kaikki olivat sekä ER:n, PR:n että Ki-67:n suhteen positiivisia. Näytteistä viidestä värjättiin PR ja viidestä Ki-67 ja värjäykset suoritettiin Seinäjoella. Näytteiden kuvaamiseen käytettyjen mikroskooppikameroiden vertailua varten oli Tampereella IMT:ssä värjätty viidestä rintasyöpänäytteestä Ki-67 (MM1, Novocastra).

Muiden kuvausteknisten seikkojen tutkimisessa käytettiin ImmunoRatio:n kalibroinnissa ja testauksessa käytettyjä, vuonna 2008 Seinäjoen keskussairaalassa värjättyjä näytteitä. Näytteet valittiin kokeisiin satunnaisesti. Mikroskoopin valotuksen vaikutusta analyysiin tutkittiin yhdeksällä näytteellä, joista kolmesta oli värjätty ER, kolmesta PR ja kolmesta Ki-67. ImmunoRatio:n kykyä analysoida eri suurennoksilla kuvattuja kuvia tutkittiin 20 näytteellä, joista kuudesta oli osoitettu ER, kahdesta PR ja 12:sta Ki-67.

Kuvien rajaamisen tarpeellisuutta tutkittiin 15 näytteellä, joista kuudesta oli osoitettu ER, kolmesta PR ja kuudesta Ki-67. ImmunoRatio:n kykyä analysoida jpg-tiedostoja tutkittiin yhdeksällä näytteellä, joista kolmesta oli värjätty ER, kolmesta PR ja kolmesta Ki-67.

ImmunoRatio rintasyövän tutkimuksessa. ER:n, PR:n ja Ki-67:n ilmenemisen heterogeenisyyden tutkimista varten värjättiin Seinäjoella kymmenestä isosta syöpäkasvaimesta (halkaisija $\geq 2,0$ cm) ER, PR ja Ki-67. Kyseiset näytteet olivat värjättyjen antigeenien suhteen positiivisia. Myös primaari- ja residiivikasvaimista värjättiin Seinäjoella sekä ER, PR että Ki-67. Kokeessa oli mukana 12 näyteparia.

3.3 Näytteiden kuvaus ja analysointi

Näytteet kuvattiin valomikroskooppiin (Leica DM3000, Leica Microsystems) liitetyllä mikroskooppikameralla (Scion CFW 1308C, Scion Corporation). Kuvien (1360 x 1024 pikseliä, 12 bittiä) otto tapahtui kannettavalla tietokoneella ImageJ – ohjelmalla (Rasband 1997–2009). Mikroskoopin valotusta säädettiin niin, että näytteestä otettu kuva muistutti tietokoneen näytöllä mahdollisimman paljon mikroskoopin okulaareista näkynyttä näkymää. Valotus pidettiin tutkimuksen ajan vakiona.

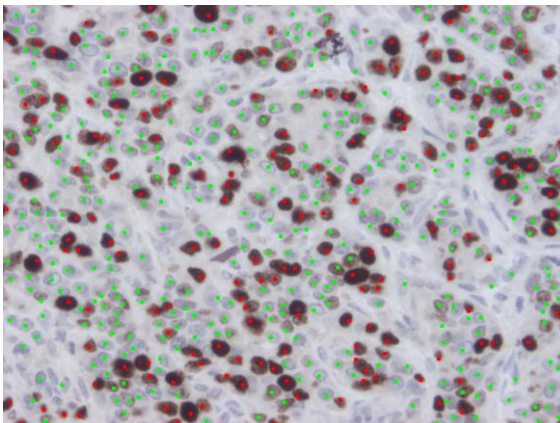
Näytteistä kuvattiin edustavaa, invasiivista syöpäsolukkoa. Ki-67-värjäyksissä kuvattiin vain voimakkaasti värjäytyneitä alueita, kun taas ER- ja PR- värjäyksissä pyrittiin kuvaamaan alueita, jotka edustivat näytteen syöpäsolukon keskimääräistä positiivisuutta mahdollisimman hyvin. Näytteestä otetun kuvan lisäksi lasilta otettiin aina myös taustakuva leikkeen ulkopuolelta. Kaikki kuvat tallennettiin tif-tiedostoina. Kuvat otettiin pääsääntöisesti 20x objektiivilla, jolloin kuvien skaala oli 4,5 pikseliä / μm .

ER- ja PR-värjäyksissä raja positiivisten ja negatiivisten näytteiden välillä oli 10 %. Ki-67-värjäyksessä rajoina toimivat luokat 0 % – 10 %, 10 % - 20 % ja yli 20 %.

3.3.1 ImmunoRatio:n kalibrointi

Jokaiselta värjäytyltä leikkeeltä kuvattiin yksi näkökenttä edustavasta invasiivisesta syöpäsolukosta. Kuvista laskettiin positiivisten syöpäsolujen prosenttiosuus kaikista soluista sekä manuaalisesti ImageJ:n Cell Counter –sovelluksella (Rasband 1997–2009) että tietokoneavusteisesti kalibroimattomalla ImmunoRatio:lla. ImmunoRatio:n virheellisesti analysoimat kuvat jätettiin kalibroinnista pois ja niiden tilalle valittiin uudet näytteet. ImmunoRatio:n katsottiin analysoineen näyte virheellisesti, jos se oli selvästi tunnistanut näytteen tumia väärin ja jos näytteen tulos poikkesi huomattavasti manuaalisen laskennan tuloksesta.

Tässä tutkimuksessa manuaalisessa analyysissä selvitettiin näytteen positiivisten solujen prosenttiosuus. Analysointi suoritettiin merkkamalla kuvaan käsin syöpäsolujen negatiiviset ja positiiviset tumat eri väreillä (Kuva 6.). Positiivisten tumien osuus kaikista tumista saatiin jakamalla positiivisten tumien lukumäärä kaikkien kuvan merkattujen tumien lukumäärällä (positiiviset + negatiiviset tumat).



Kuva 6. Näytteiden manuaalinen analysointi. Kuvan Ki-67-värjäykseen on merkattu positiiviset tumat punaisella värillä ja negatiiviset tumat vihreällä värillä ImageJ:n Cell Counter –sovelluksella (Rasband 1997-2009). Näytteen tulos saatiin jakamalla positiivisten tumien lukumäärä (=punaiset) kaikkien tumien lukumäärällä (= punaiset + vihreät).

Käsin laskettujen tulosten luotettavuutta tarkasteltiin tutkimalla saman analysoijan eri laskentakertojen välistä vaihtelua. Kokeessa oli mukana 20 kalibrointisarjan näytettä, joista jokainen analysoitiin kahdesti peräkkäin. Myös kahden eri arvioitsijan välisiä eroja manuaalisessa analyysissä tutkittiin vertailemalla kahden eri henkilön analysoimia tuloksia samoista näytteistä. Mukana oli 25 kalibrointisarjan näytettä, jotka kummatkin henkilöt analysoivat kertaalleen itsenäisesti.

3.3.2 ImmunoRatio:n testaus

Jokaiselta värjätyltä leikkeeltä kuvattiin invasiivisesta syöpäsolukosta edustava näkökenttä. Saadut kuvat analysoitiin kalibroidulla ImmunoRatio:lla ja manuaalisesti ImageJ:n Cell Counter – sovelluksella (Rasband 1997-2009). Poikkeavista tuloksista tehtiin lisäanalyysjä kuvaamalla kyseenomaisista näytteistä kymmenen uutta näkökenttää, jotka analysoitiin sekä manuaalisesti että ImmunoRatio:lla. Tulos katsottiin poikkeavaksi, jos se oli manuaalisen laskennan mukaan negatiivinen mutta ImmunoRatio:n mukaan positiivinen tai päinvastoin.

ImmunoRatio:n toistettavuutta tutkittaessa värjätyltä näytelasilta kuvattiin kymmenen peräkkäistä näkökenttää täysin samasta kohtaa kudosleikettä. Saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla. Lisäksi jokaisesta näytteestä valittiin yksi kuva, joka analysoitiin kymmenen kertaa peräkkäin ImmunoRatio:lla.

3.3.3 Näytteiden värjästeknisten seikkojen tutkiminen

Laboratorioiden ja värjäysautomaattien vertailu. Kahden eri värjäysautomaatin peräkkäisten värjäysten vaihtelua tarkasteltiin kuvaamalla yksi näkökenttä saman näytteen eri ajoissa värjäytyistä leikkeistä. Kuvat pyrittiin ottamaan mahdollisimman samalta kohtaa jokaista kudosleikettä. Saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla. Kahden eri laboratorion välistä vertailua ER- ja Ki-67 – värjäyksissä tarkasteltiin valitsemalla edellisistä näytteistä kaksi peräkkäistä leikettä, joista toinen oli värjätty Seinäjoella ja toinen Tampereella. Valituista näytteistä kuvattiin yksi näkökenttä ja saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla. Kuvat pyrittiin ottamaan mahdollisimman samalta kohtaa kudosleikettä.

Värjäysten optimointi. Sekä eri Ki-67-vasta-aineen (MM1, Novocastra) laimennoksilla että erilaisilla hematoksyliinivärjäyksillä värjätyiltä peräkkäisiltä leikkeiltä kuvattiin yksi

näkökenttä mahdollisimman samalta kohdalta kudosta jokaiselta leikkeeltä. Saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla. Eri Ki-67-vasta-aineen klooneilla (MM1, Novocastra, MIB-1, Dako) värjätyistä rinnakkaisista leikkeistä kuvattiin viisi näkökenttää mahdollisimman samoilta kohdilta. Saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla.

3.3.4 Näytteiden kuvaamiseen liittyvät seikat

Kuvien lukumäärä per näyte. Tutkittaessa kuvien lukumäärän vaikutusta näytteen tulokseen, kuvattiin värjätyiltä leikkeiltä 12 näkökenttää alueilta, jotka edustivat mahdollisimman hyvin näytteiden positiivisten solujen prosenttiosuuksia. Saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla niin, että jokaiselle näytteelle saatiin 1-12 kuvan keskiarvotulokset.

Mikroskoopin valotusasetukset. Värjätyiltä leikkeiltä kuvattiin neljä peräkkäistä näkökenttää neljällä eri mikroskoopin valotuksella; kirkas, normaali, tummahko ja tumma. Kuvat otettiin jokaisella valotuksella täysin samalta kohdalta kudოსleikettä. Normaali valotus vastasi valotusta, jolla näytteet kuvattiin normaalisti tutkimuksen aikana. Saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla.

Kuvien tallennusmuoto. Värjätystä leikkeestä kuvattiin yksi näkökenttä, joka tallennettiin normaaliin tapaan tif-tiedostona. Sama kuva muutettiin Irfanview-ohjelmalla (ohjelmaversio 4.25) jpg-tiedostoksi kuudella eri laadulla; 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 % ja 10 %. Kaikki jpg-tiedostot sekä alkuperäinen tif-tiedosto analysoitiin ImmunoRatio:lla.

Kuvaaminen eri objektiiveilla. Värjätyistä leikkeistä otettiin kuvat sekä 20x objektiivilla että 10x ja 40x objektiiveilla samasta kohtaa kudოსleikettä. 20x ja 40x objektiiveilla otetut kuvat analysoitiin käsin ImageJ:n Cell Counter-sovelluksella (Rasband 1997-2009) sekä automaattisesti ImmunoRatio:lla. 10x objektiivilla otetut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla. 10x objektiivilla kuvattujen kuvien skaala oli 2,25 pikseliä/μm ja 40x objektiivilla 9,0 pikseliä/μm.

Kuvien muokkaus. Värjätyistä leikkeistä kuvatuista näkökentistä rajattiin pois ImageJ-ohjelman rajaustyökalun (Rasband 1997-2009) avulla kaikki muut komponentit paitsi syöpäsolujen tumat. Alkuperäiset ja rajatut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla.

Mikroskooppikameroiden vertailu. Tutkimuksessa testattiin kuuden eri mikroskooppikameran sekä kahden virtuaalimikroskopilaitteiston soveltuvuutta ImmunoRatio:n käyttöön. Mukana olivat seuraavat mikroskooppikamerat: Altra 20 (Soft Imaging), Colorview II (Soft Imaging), Leica DFC 290 HD (Leica Microsystems), Mightex 3MP Color CMOS (Mightex), Nikon DS-Fi1 (Nikon) ja Scion CFW-1310x (Scion Corporation). Mukana olleet kaksi virtuaalimikroskopialaitteistoa olivat Surveyor (Objective Imaging), jossa kamerana QImaging QiCAM Fast sekä Scanscope XT (Aperio). Värjätyistä leikkeistä kuvattiin jokaisella kameralla kymmenen näkökenttää, jotka analysoitiin ImmunoRatio:lla. Kuvat otettiin kustakin näytteestä runsaimmin värjäytyneiltä alueilta, mutta alueet eivät välttämättä olleet samoja jokaisella kameralla. Saaduista tuloksista laskettiin kullakin kameralla kuvattujen näkökenttien keskiarvotulos jokaiselle viidelle näytteelle. Kolmea mikroskooppikameraa (Altra 20, Leica DFC 290 HD ja Nikon DS-Fi1) testattiin Seinäjoella ja loput mikroskooppikamerat ja kummatkin virtuaalimikroskopialaitteistot testattiin Tampereella Jorma Isolan ja Vilppu Tuomisen toimesta.

3.3.5 ImmunoRatio rintasyövän tutkimuksessa

ER:n, PR:n ja Ki-67:n heterogeenisyys. Jokaiselta värjätyltä leikkeeltä kuvattiin kymmenen näkökenttää syöpäkudoksen reunaosilta sekä kymmenen näkökenttää sen sisäosista. Saadut kuvat analysoitiin ImmunoRatio:lla ja kasvaimen reuna- ja sisäosille määritettiin keskiarvotulokset.

ER, PR ja Ki-67 primaari- ja residivikasvaimissa. Jokaiselta värjätyltä leikkeeltä kuvattiin viisi näkökenttää, jotka analysoitiin ImmunoRatio:lla. Jokaiselle näytteelle laskettiin keskiarvotulos viiden kuvan perusteella.

3.3.6 Tilastoanalyysi

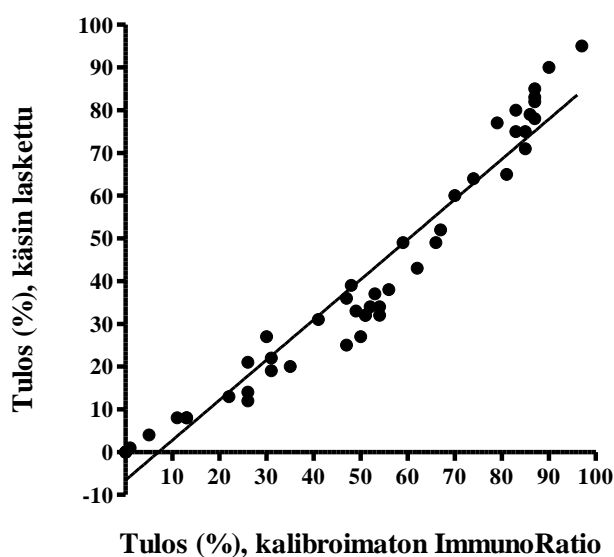
Näytteiden ImmunoRatio:n analysoimia ja manuaalisesti määritettyjä tuloksia analysoitiin GraphPad Prism 4- ja InStat3 – ohjelmilla (GraphPad Software). Analyyseissä kahdensuuntaista p-arvoa $< 0,05$ pidettiin tilastollisesti merkittävänä. Pearsonin korrelaatiokerrointa käytettiin mittaamaan arvojen välistä lineaarista korrelaatiota.

ImmunoRatio:n kalibroinnissa ImmunoRatio:lle määritettiin kalibrintikertoimet vertailemalla kalibrintisarjan näytteiden manuaalisia ja kalibroimattoman ImmunoRatio:n tuloksia epälineaarisen regressioanalyysin avulla. Analyysissä suoran sovitus tapahtui kolmannen asteen yhtälön mukaisesti, ja yhtälön kulmakertoimet toimivat ImmunoRatio:n kalibraatiokertoimina. Sekä kalibroimattoman että kalibroidun ImmunoRatio:n tuloksia verrattiin samojen näytteiden manuaalisesti määritettyihin tuloksiin myös lineaarisella regressioanalyysillä.

4. Tulokset

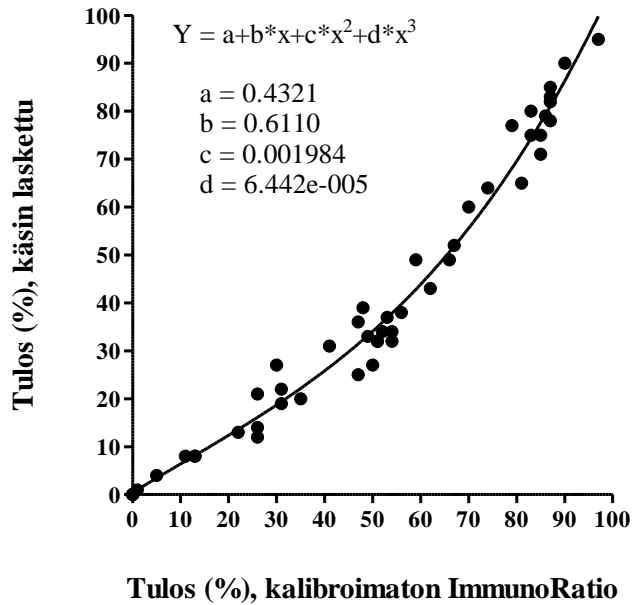
4.1 ImmunoRatio:n kalibrointi

ImmunoRatio:n kalibrointi. ImmunoRatio:n kalibrointi aloitettiin kalibroimattoman ImmunoRatio:n testaamisella. Kalibrintisarjan kuvista kalibroimattomalla ImmunoRatio:lla analysoitujen ja manuaalisesti määritettyjen tulosten perusteella suoritettu lineaarinen regressioanalyysi ei tuottanut siistiä suoraa pisteparven sekaan (Kuva 7.). Tästä huolimatta ImmunoRatio:n ja käsin laskettujen tulosten korrelaatio oli tilastollisesti erittäin merkittävää ($p < 0,0001$, $r = 0,9718$), joten kalibroimaton ImmunoRatio toimi tyydyttävästi. Suoran kulmakerroin oli 0,9389.



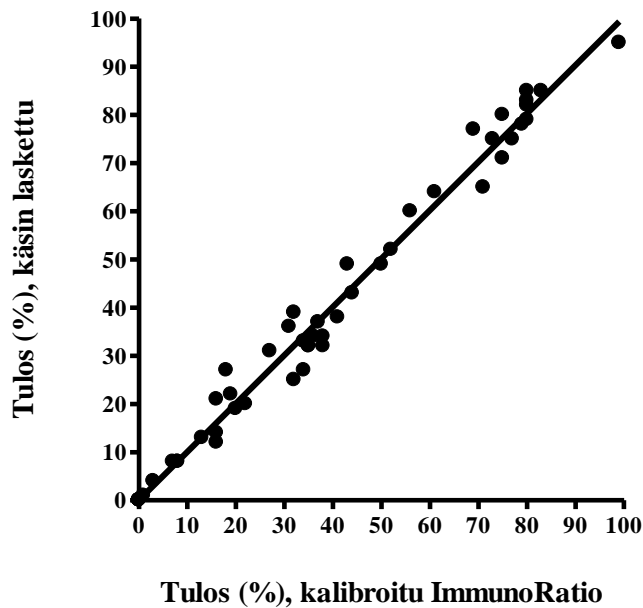
Kuva 7. Kalibrintisarjan lineaarinen regressioanalyysi I. Kalibrintisarjan näytteistä kuvattujen kuvien manuaalisesti ja kalibroimattomalla ImmunoRatio:lla määritettyjen tulosten vertailu. Tulokset on esitetty positiivisten solujen prosenttiosuuksina. Tulosten välinen Pearsonin korrelaatiokerroin oli 0,9718 ja suoran kulmakerroin 0,9389.

Koska Kuvan 7. suoran sovitus näytti olleen liian suurpiirteinen, suoritettiin samoille tuloksille epälineaarinen regressioanalyysi kolmannen asteen yhtälön mukaan. Tällöin suora asetui siististi pisteparven keskelle (Kuva 8.). Suoran sovittaneita kolmannen asteen yhtälön kertoimia käytettiin ImmunoRatio:n kalibrointikertoimina.



Kuva 8. Kalibrointisarjan epälineaarinen regressioanalyysi. Kalibraatiosarjan näytteistä kuvattujen kuvien manuaalisen ja kalibroimattomalla ImmunoRatio:lla määritettyjen tulosten vertailu. Tulokset on esitetty positiivisten solujen prosentiosuuksina. Kuvan suora sovitettiin kolmannen asteen yhtälön mukaisesti. Yhtälö ja sen kertoimet on esitetty kuvassa. Kertoimet toimivat ImmunoRatio:n kalibrointikertoimina.

Kalibraatiokertoimilla kalibroidulla ImmunoRatio:lla uudelleen analysoidut kalibraatiosarjan kuvat vastasivat lähes täysin samoista kuvista käsins laskettuja tuloksia ($p < 0,0001$, Kuva 9.), joten kalibraatiokertoimet toimivat hyvin. Kuvan 9. suoran kulmakertoimeksi saatiin 1,004 ja Pearsonin korrelaatiokertoimeksi 0,9915.



Kuva 9. Kalibrointisarjan lineaarinen regressioanalyysi II. Kalibrointisarjan näytteiden kuvista manuaalisesti ja kalibroidulla ImmunoRatio:lla analysoitujen tulosten vertailu. Tulokset on esitetty positiivisten solujen prosenttiosuuksina. Tulosten välinen Pearsonin korrelaatiokerroin oli 0,9915 ja suoran kulmakertoimen 1,004.

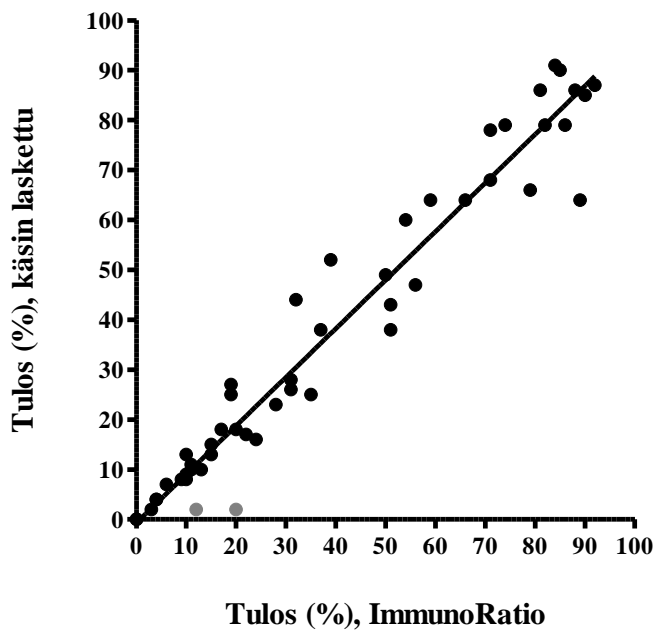
Manuaalinen analyysi. ImageJ:n Cell Counter – sovelluksella sekä saman henkilön (S) että eri henkilöiden (S ja M) manuaalisten analyysien vaihtelut olivat erittäin pieniä (Taulukko 5.).

Taulukko 5. Manuaalisen analyysin vaihtelut. Saman henkilön (S vs. S) ja eri henkilöiden (S vs. M) samojen näytteiden manuaalisesti määritettyjen tulosten korrelaatiokertoimet ja p-arvot. Sama henkilö (S) analysoi kahdesti peräkkäin 20 näytettä ja eri henkilöt (S ja M) 25 näytettä itsenäisesti.

| Arvioitsija(t) | Keskimääräinen ero (prosenttiyksikköä) | Eron vaihteluväli (prosenttiyksikköä) | Pearson r | p-arvo |
|----------------|--|---------------------------------------|-----------|----------|
| S vs. S | 1 | 0 - 3 | 0.9986 | < 0,0001 |
| S vs. M | 2 | 0 - 7 | 0.9849 | < 0,0001 |

4.2 Kalibroidun ImmunoRatio:n testaus

ImmunoRatio:n testaus. ImmunoRatio:n kalibroinnissa määritettyjen kalibraatiokertoimien toimivuutta testattiin testisarjan kuvilla. Kalibroidulla ImmunoRatio:lla saadut tulokset testisarjan kuvista vastasivat hyvin samojen kuvien manuaalisesti laskettuja tuloksia ($p < 0,0001$, Kuva 10.). Linearisella regressioanalyysillä määritetyn suoran kulmakertoimeksi saatiin 0,9730 ja Pearsonin korrelaatiokertoimeksi 0,9732. Värjäyskohtaiset Pearsonin korrelaatiokertoimet ja p-arvot olivat ER:lle 0,9764 ja $< 0,0001$, PR:lle 0,9549 ja $< 0,0001$ sekä Ki-67:lle 0,9193 ja $< 0,0001$.



Kuva 10. Testisarjan lineaarinen regressioanalyysi. Testisarjan näytteistä kuvattujen kuvien manuaalisesti ja ImmunoRatio:lla määritettyjen tulosten vertailu. Tulokset on esitetty positiivisten solujen prosentiosuuksina. Tulosten välinen Pearsonin korrelaatiokerroin oli 0,9732 ja suoran kulmakerroin 0,9730.

Kahdesta Kuvan 10. alareunassa harmaalla merkitystä poikkeavasta tuloksesta suoritettiin lisäanalyysyjä (vasen näyte: PR-värjäys, oikea näyte Ki-67-värjäys). Lisäanalyysissä näytteistä kuvattiin 10 uutta näkökenttää, jotka analysoitiin sekä manuaalisesti että ImmunoRatio:lla. Lisäanalyysien perusteella PR-värjäys analysoitui oikein ($r = 0.8307$ ja $p = 0.0029$), mutta Ki-67-värjäyksen manuaalisesti ja ImmunoRatio:lla määritettyjen tulosten välinen korrelaatio ei ollut tilastollisesti merkittävää ($r = 0,3422$ ja $p = 0,3331$).

ImmunoRatio:n toistettavuus. ImmunoRatio:n analyysit olivat tasaisen luotettavia, kun tarkasteltiin kolmesta näytteestä kuvattuja kymmentä peräkkäistä näkökenttää. Kuvien ImmunoRatio:lla analysoidut tulokset poikkesivat toisistaan yhden prosenttiyksikön verran yhden näytteen kohdalla. Muuten tulokset olivat kokeessa aina samoja. Saman kuvan toistuva analysointi ImmunoRatio:lla tuotti aina saman tuloksen.

4.3 Värjäystekniset ominaisuudet

Tutkimuksessa selvitettiin näytteiden eri värjäysteknisten seikkojen vaikutuksia ImmunoRatio:n analyysiin. Kaikissa värjäyksissä oli mukana kontrolleina Tampereella IMT:ssä viljeltyjä MCF-7 – soluja. Positiivisten kontrollien värjäyskohtaiset tulokset Seinäjoella ja Tampereella on esitetty Taulukossa 6. Negatiivisten kontrollien tulokset olivat aina 0 %.

Taulukko 6. Positiiviset MCF-7-kontrollit. Tutkimuksessa käytettyjen positiivisten kontrollien keskiarvotulokset ja vaihteluvälit laboratorioittain.

| Värjäys | Tulos, keskiarvo | Tulos, vaihteluväli | Värjäyskerrat |
|------------------|------------------|---------------------|---------------|
| Seinäjäki | | | |
| ER | 93 % | 83 % - 100 % | 6 |
| PR | 60 % | 59 % - 61 % | 2 |
| Ki-67 | 100 % | 100 % | 6 |
| Tampere | | | |
| ER | 61 % | 59 % - 64 % | 5 |
| Ki-67 | 95 % | 94 % - 98 % | 5 |

4.3.1 Värjäysautomaatit

Kahden eri värjäysautomaatin ER- ja Ki-67 – värjäyksien vaihtelut viidellä eri värjäyskerralla olivat hyvin pieniä (Taulukko 7). Hieman enemmän vaihtelua havaittiin Ki-67 – värjäyksissä, mutta vaihtelu ei siltikään ollut kovin merkityksellistä näytteen tulosta ajatellen. Kummallakin värjäysautomaatilla osoitettiin Ki-67 20 näytteestä ja ER 10 näytteestä.

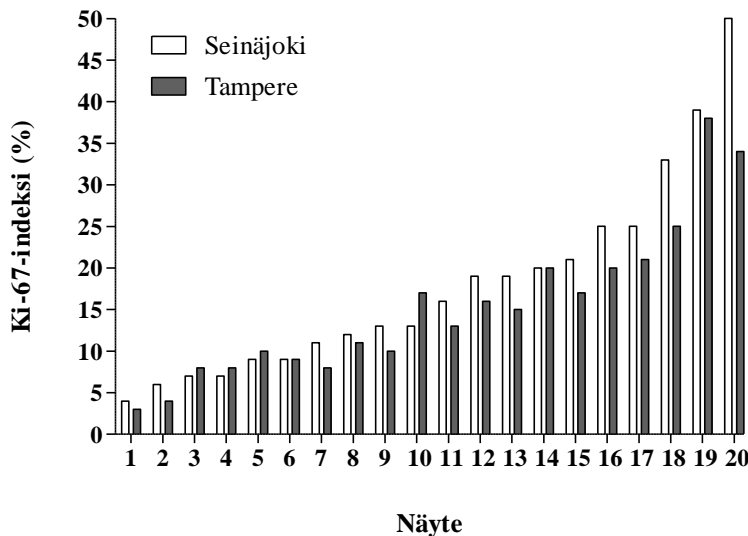
Taulukko 7. Värjäysautomaattien vertailu. Kahden värjäysautomaatin ER- ja Ki-67 – värjäyksien vaihtelu viidellä eri värjäyskerralla. Mukana oli 10 ER:n suhteen värjättyä näytettä ja 20 Ki-67:n suhteen värjättyä näytettä.

| Värjäys | Tulosten keskimääräinen variaatiokerroin (%) | Tulosten variaatiokerroin, vaihteluväli (%) |
|-----------------------|--|---|
| ER (n = 10) | | |
| Bond Max | 6,5 | 1,2 - 16,1 |
| Autostainer | 13,2 | 1,2 - 31,2 |
| Ki-67 (n = 20) | | |
| Bond Max | 17,3 | 7,3 - 34,0 |
| Autostainer | 15,6 | 4,1 - 39,1 |

Kokeessa oli jokaisella värjäyskerralla mukana myös positiivinen kontrolli. ER-kontrollien tulosten variaatiokerroin oli Bond Max:lla 8,6 % ja Autostainer:lla 3,4 %. Vastaavat arvot Ki-67-kontrolleilla oli Bond Max:lla 0,5 % ja Autostainer:lla 3,6 %.

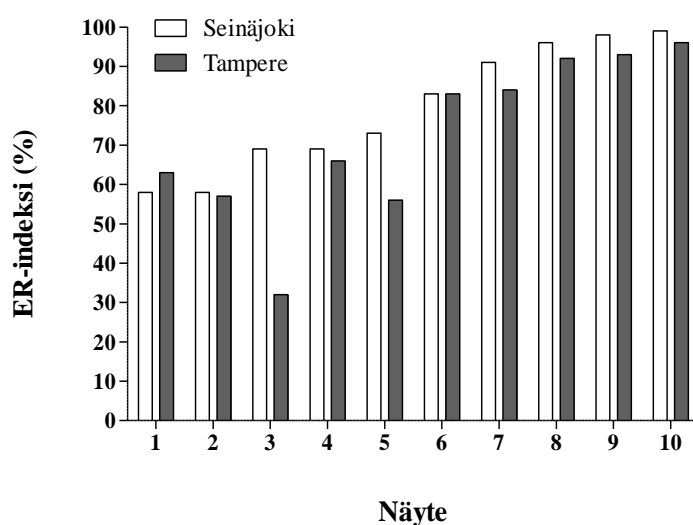
4.3.2 Kahden laboratorion vertailu ER- ja Ki-67-värjäyksissä

Seinäjoella ja Tampereella Ki-67:n suhteen värjättyjen kahdenkymmenen rinnakkaisen näytteen tulokset erosivat 0 – 16 prosenttiyksikköä, keskiarvoeron ollessa 3 prosenttiyksikköä (Kuva 11.). Laboratorioiden välinen korrelaatio oli tilastollisesti erittäin merkittävää ($p < 0,0001$, $r = 0,9553$). Positiivisten kontrollien ero oli 3 prosenttiyksikköä.



Kuva 11. Kahden laboratorion vertailu Ki-67-värjäyksissä. Kuvassa on esitetty 20 näytteen rinnakkaisten värjäysten tulokset Seinäjoella ja Tampereella.

Kymmenen rinnakkaisen näytteen ER-indeksien erot Seinäjoen ja Tampereen välillä olivat 1 – 37 prosenttiyksikköä, keskiarvoeron ollessa 8 prosenttiyksikköä (Kuva 12.). Tulosten välinen korrelaatio oli tilastollisesti hyvin merkittävää ($p = 0,0034$, $r = 0,8243$). Positiivisten kontrollien ero oli 34 prosenttiyksikköä.



Kuva 12. Kahden laboratorion vertailu ER-värjäyksissä Kuvassa on esitetty 10 näytteen rinnakkaisten värjäysten tulokset Seinäjoella ja Tampereella.

4.3.3 Vasta-aineen pitoisuuden ja kloonin merkitys ImmunoRatio:n analyysissä

Vasta-aineen pitoisuudella huomattiin olevan selkeä vaikutus ImmunoRatio:n analyysiin (Taulukko 8.). Kokeen perusteella ImmunoRatio:lle sopiva laimennoskaala Ki-67-vasta-aineella (MM1, Novocastra) olisi noin 1:50 – 1:200, optimaalisen laimennoksen ollessa 1:100. Laimeammat tai väkevämmät vasta-aineen laimennokset eivät värjänneet näytteitä riittävän tarkasti, jolloin tulokset selvästi poikkesivat optimaalisesta.

Taulukko 8. Vasta-aineen laimennoksen merkitys ImmunoRatio:n analyysissä. Eri Ki-67:n (MM1, Novocastra) vasta-ainelaimennoksilla värjättyjen näytteiden ImmunoRatio:lla analysoidut tulokset. Taulukossa on suluissa esitetty vasta-aineen laimennos. Laimennos 1:100 oli optimaalinen.

| Näyte | Ki-67-indeksi, % (1:1000) | Ki-67 -indeksi, % (1:400) | Ki-67 -indeksi, % (1:100) | Ki-67 -indeksi, % (1:25) | Ki-67 -indeksi, % (1:10) |
|-------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 20 | 24 | 42 | 51 | 71 |
| 2 | 9 | 10 | 15 | 22 | 28 |
| 3 | 17 | 20 | 29 | 53 | 51 |
| 4 | 4 | 6 | 6 | 7 | 14 |
| 5 | 12 | 9 | 23 | 24 | 33 |
| 6 | 22 | 35 | 42 | 57 | 52 |
| 7 | 10 | 11 | 23 | 22 | 29 |
| 8 | 4 | 6 | 8 | 11 | 15 |
| 9 | 5 | 8 | 11 | 19 | 15 |
| 10 | 9 | 16 | 19 | 29 | 78 |

Vasta-aineen kloonilla ei taas huomattu olevan merkitystä värjäystulosta ja siten ImmunoRatio:n analyysiä ajatellen. Kahdenkymmenen näytteen rinnakkaiset värjäykset kahdella eri Ki-67 –vasta-aineen kloonilla (MIB-1, Dako ja MM1, Novocastra) vastasivat lähes täydellisesti toisiaan, kun ne analysoitiin ImmunoRatio:lla ($r = 0.9692$ ja $p < 0.0001$).

4.3.4 Vastavärjäyksen merkitys ImmunoRatio:n analyysissä

Näytteiden vastavärjäyksen optimointi osoittautui erittäin tärkeäksi tekijäksi ajatellen ImmunoRatio:n analyysiä. Liian laimealla tai väkevällä hematoksyliinillä vastavärjätyt näytteet analysoituivat usein virheellisesti ja tulokset saattoivat poiketa huomattavasti optimaalisesta värjäyksestä (Taulukko 9.).

Taulukko 9. Vastavärjäyksen vaikutus ImmunoRatio:n analyysiin. Eri hematoksyliinipitoisuuksilla ja/tai vaikutusajoilla kahdessa eri laboratoriossa vastavärjätyjen Ki-67 –värjäyksien ImmunoRatio:lla analysoidut tulokset. Seinäjoella ja Tampereella värjätyt näytteet eivät olleet rinnakkaisia.

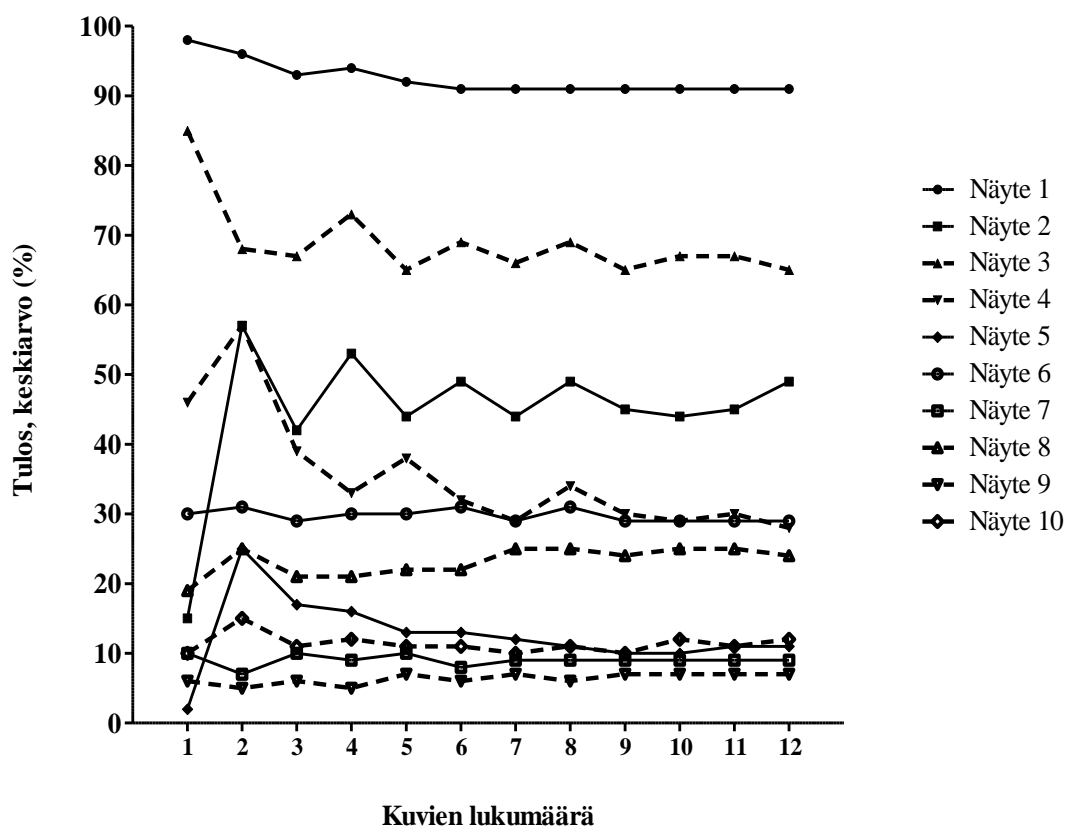
| Näyte | Ki-67 -indeksi (%), laimea hematoksyliini | Ki-67 -indeksi (%), optimaalinen hematoksyliini | Ki-67 -indeksi (%), väkevä hematoksyliini |
|------------------|--|--|--|
| Seinäjoki | | | |
| 1 | 46 | 6 | 2 |
| 2 | 42 | 13 | 15 |
| 3 | 100 | 49 | 46 |
| Tampere | | | |
| 4 | 100 | 7 | 6 |
| 5 | 100 | 22 | 23 |
| 6 | 100 | 41 | 40 |

4.4 Näytteiden kuvaamiseen liittyvät seikat

Näytteiden kuvaamiseen liittyvät käytännöt voivat vaihdella laboratoriosta toiseen. Jotta ImmunoRatio soveltuisi mahdollisimman laajaan käyttöön, testattiin tutkimuksessa useita näytteiden kuvaamiseen liittyviä seikkoja.

4.4.1 Kuvien lukumäärä per näyte

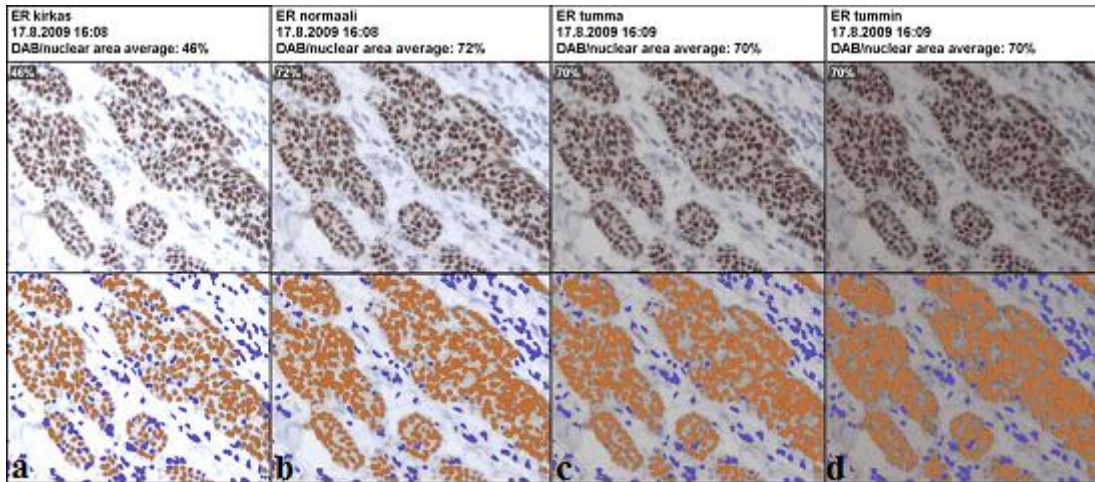
Kokeen perusteella kolmen kuvan keskiarvo oli riittävän tarkka tulos kuvaamaan näytteen positiivisten solujen osuutta (Kuva 13.). Lisäkuvien ottaminen ei muuttanut tulosta merkittävästi suuntaan tai toiseen.



Kuva 13. Kuvien lukumäärän vaikutus tuloksen vaihteluun. Kuvassa y-akselilla on esitetty näytteiden tulokset 1 – 12 kuvan keskiarvoina.

4.4.2 Mikroskoopin valotus

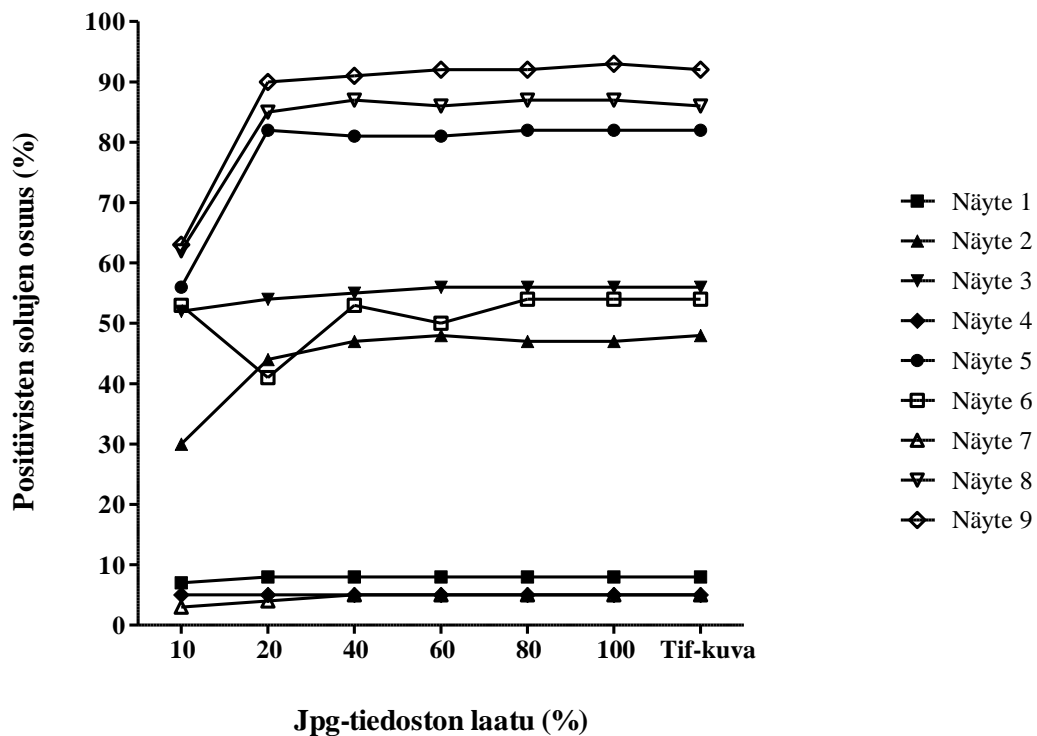
Kokeen perusteella mikroskoopin valotuksella ei ollut kovin suurta merkitystä analyysissä, sillä ImmunoRatio pystyi analysoimaan hyvin eri valotuksilla otettuja kuvia (Kuva 14.) Ylivalottuneet kuvat eivät kuitenkaan analysoituneet oikein, toisin kuin jopa kaksi astetta optimaalisesta valotuksesta tummemmat kuvat, joiden analyysit onnistuivat poikkeuksetta.



Kuva 14. Mikroskoopin valotus. ImmunoRatio:n analyysit neljällä eri mikroskoopin valotuksella kuvatusta ER-värjäyksestä; a). ylivalottunut kuva, tulos 46 %, b). normaali valotus, tulos 72 %, c.) heikohko valotus, tulos 70 % ja d.) heikko valotus, tulos 70 %.

4.4.3 Kuvien tallennusmuodon vaikutus analyysiin

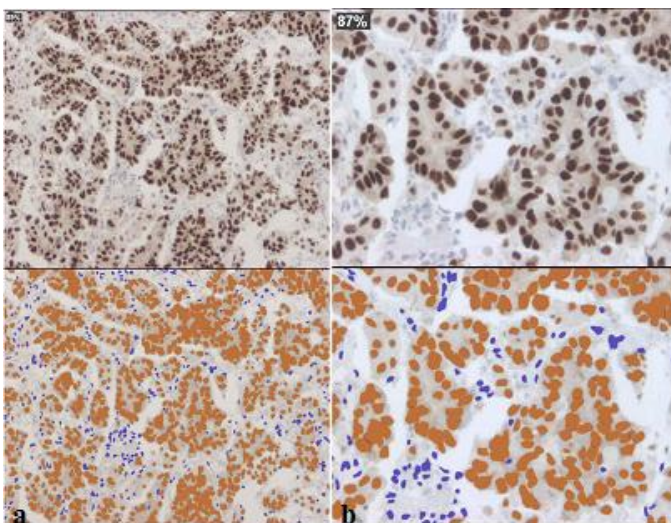
ImmunoRatio analysoi yhtä hyvin sekä jpg- että tif-tiedostoja (Kuva 15.). Jpg-tiedoston laadun alarajan todettiin olevan IrfanView-ohjelmalla noin 40 %, sillä sitä huonompilaatuiset kuvat eivät enää analysoituneet oikein. Jpg-tiedoston laadun ollessa 40 %, oli kuva kooltaan enää 1,3 % alkuperäisestä tif-tiedostosta. Vastaavasti laadun ollessa 100 %, oli alkuperäisen tif-tiedoston koosta jäljellä enää noin 20 %.



Kuva 15. Jpg-tiedoston laadun vaikutus ImmunoRatio:n analyysiin. ImmunoRatio analysoi oikein jpg-tiedostoja tallennettuna laaduilla 40 % - 100 %.

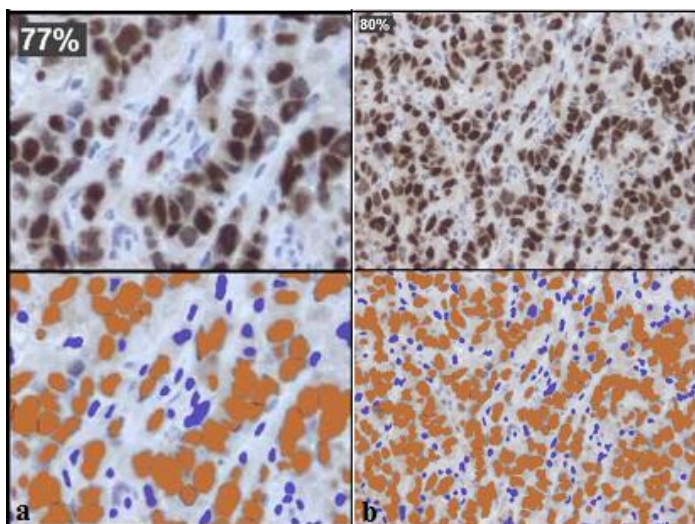
4.4.4 Kuvaaminen eri suurennoksilla

ImmunoRatio:lla analysoitiin 20x objektiivin lisäksi myös 10x objektiivilla kuvattuja näkökenttiä, ja myös nämä kuvat analysoituivat oikein (Kuva 16.). Tulokset 10x objektiivilla otetuista kuvista vastasivat samoista näytteistä 20x objektiivilla otettujen kuvien tuloksia ($p < 0,0001$, $r = 0,9976$).



Kuva 16. Kuvaaminen pienemmällä suurennoksella. Kuvassa esitetty a.) 10x objektiivilla otetun kuvan ImmunoRatio:n analyysi, tulos 89 % positiivisia soluja ja b.) samasta näytteestä samasta kohtaa 20x objektiivilla otetun kuvan ImmunoRatio:n analyysi, tulos 87 % positiivisia soluja. Kuvan a. skaala on 2,25 pikseliä/ μm ja kuvan b. 4,5 pikseliä/ μm .

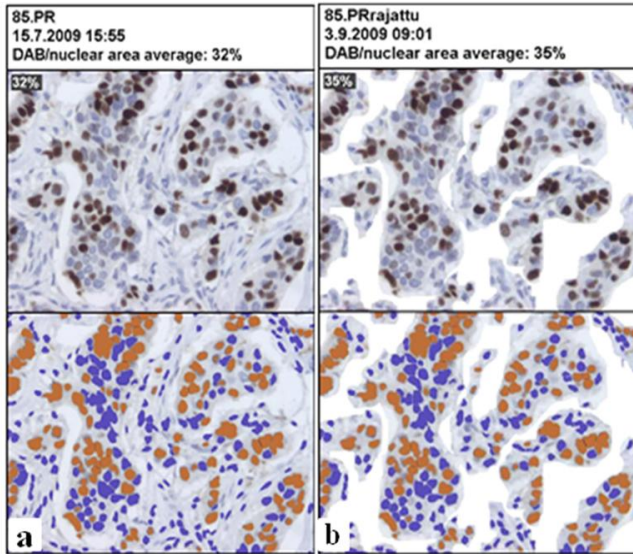
Myös 40x objektiivilla otettuja kuvia (skaala 9,0 pikseliä / μm) ImmunoRatio analysoi luotettavasti (Kuva 17.). Pearsonin korrelaatiokertoimeksi saatiin 0,9721 ja p-arvoksi $<0,0001$, kun tuloksia verrattiin samoista näytteistä 20x objektiivilla otettujen kuvien tuloksiin. Lisäksi 40x objektiivilla kuvattujen kuvien tulokset vastasivat merkittävästi samojen kuvien käsin laskettuja arvoja (p-arvo $<0,0001$, $r = 0,9570$).



Kuva 17. Kuvassa esitetty a.) 40x objektiivilla otetun kuvan ImmunoRatio:n analyysi, tulos 77 % positiivisia soluja ja b.) samasta näytteestä samasta kohtaa 20x objektiivilla otetun kuvan ImmunoRatio:n analyysi, tulos 80 % positiivisia soluja. Kuvan a. skaala on 9,0 pikseliä/ μm ja kuvan b. 4,5 pikseliä/ μm .

4.4.5 Kuvien rajaaminen

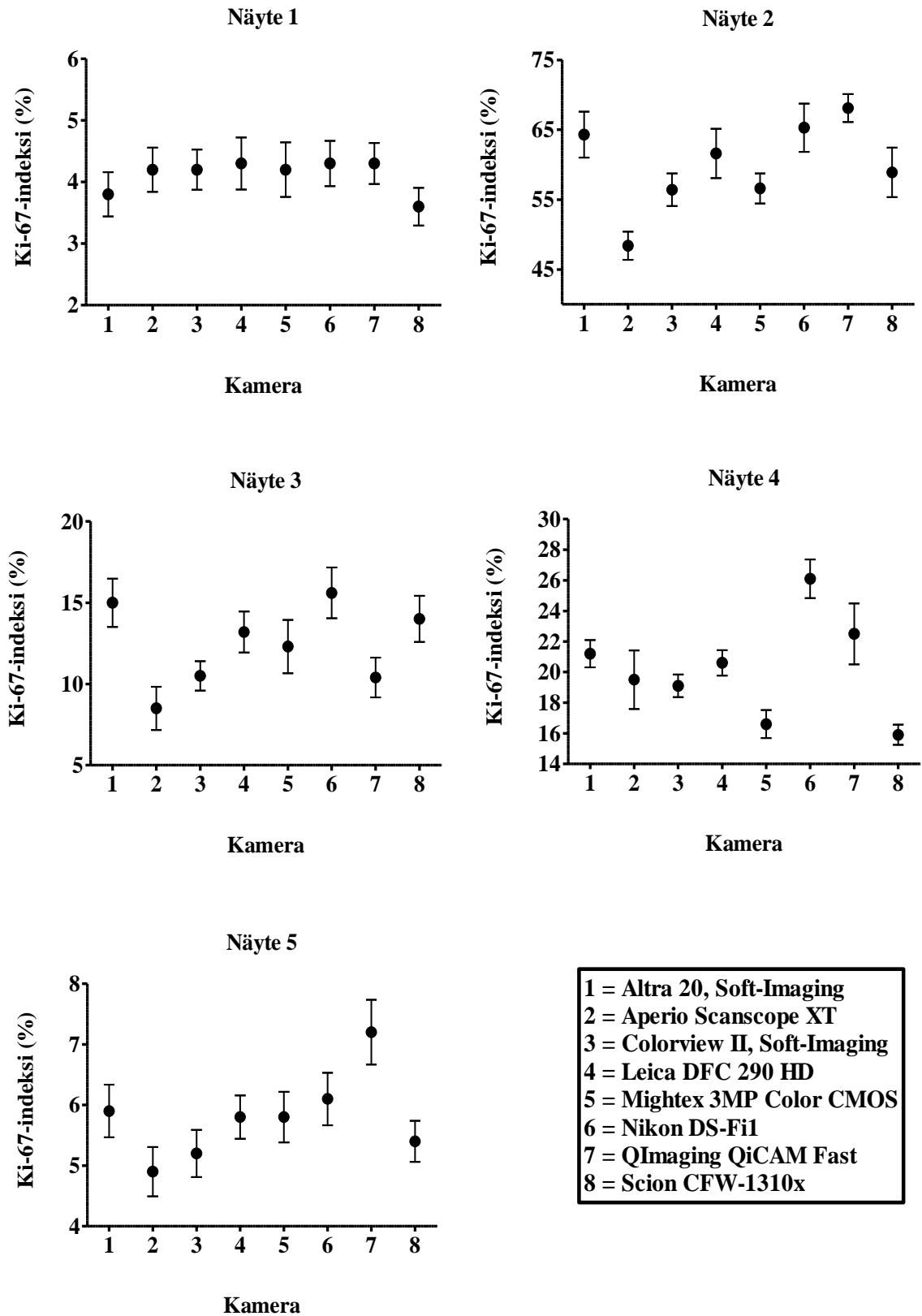
Vaikka ImmunoRatio saattoi joissain tapauksissa ottaa laskuihin mukaan muitakin kuvan komponentteja kuin syöpäsolujen tumia, ei näiden komponenttien poisrajaamisen todettu olevan tarpeellista (Kuva 18.). Viidentoista näytteen perusteella alkuperäisen kuvan tulos muuttui rajauksessa keskimäärin 5 prosenttiyksikköä, vaihteluvälin ollessa 0 – 13 prosenttiyksikköä. ImmunoRatio:n analysoimien alkuperäisten ja rajattujen kuvien tulosten korrelaatio oli tilastollisesti erittäin merkittävää (p $<0,0001$, $r = 0,9964$).



Kuva 18. Kuvien rajaaminen. Kuvassa esitetty sekä alkuperäinen PR-värjäys että alkuperäisestä kuvien rajaamisella ei havaittu olleen merkitystä näytteen lopputuloksessa. a.) Alkuperäinen PR-värjäys, tulos 32 %, b.) kuvasta rajattu pois syöpäsolukkoon kuulumattomat komponentit, tulos 35 %.

4.4.6 Mikroskooppikameroiden ja virtuaalimikroskopiaalaitteistojen vertailu

Kokeen perusteella mikroskooppikameran mallilla, merkillä tai hinnalla ei ole merkitystä ImmunoRatio:ta käytettäessä. Kuudella eri digitaalimikroskooppikameralla ja kahdella eri virtuaalimikroskopiaalaitteistolla otettujen kuvien tulokset samoista näytteistä on esitetty Kuvassa 19. Kuvassa on esitetty kullakin kameralla otettujen kuvien keskiarvo ja keskiarvon keskivirheet. ImmunoRatio analysoi jokaisella kameralla otettuja kuvia oikein, eli otti analyysiin mukaan syöpäsolujen tumat ja jätti muut kuvan komponentit huomioimatta.

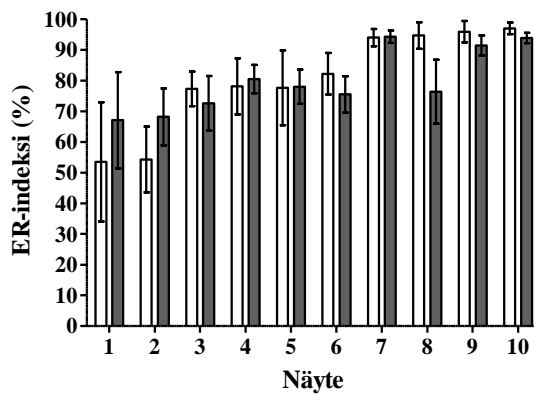


Kuva 19. Kameravertailu. Kuuden eri mikroskooppikameran (kamerat 1,3-6,8) ja kahden virtuaalimikroskoopialaitteiston (kamerat 2 ja 7) ottamien kuvien ImmunoRatio:n tulokset viidestä näytteestä. Kuvissa on esitetty kullakin kameralla otettujen kymmenen kuvan keskiarvo keskiarvon keskivirheeseen.

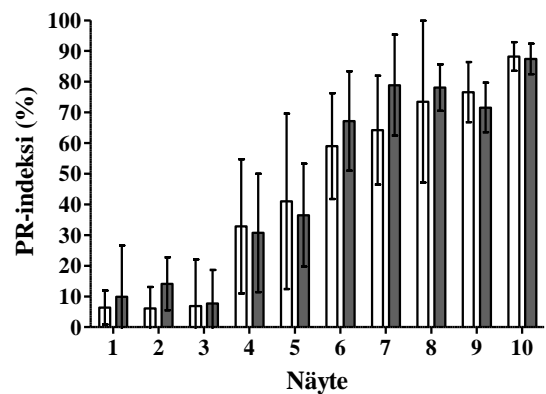
4.5 ER:n, PR:n ja Ki-67:n ilmenemisen heterogeenisyys

Kymmenen ison kasvaimen perusteella ER:n, PR:n ja Ki-67:n ilmeneminen kasvaimien reuna- ja sisäosien välillä oli tasaista (Kuva 20.). Ki-67:n ja PR:n värjäytymisen korrelaatio kasvaimen reuna- ja sisäosien välillä oli tilastollisesti erittäin merkittävää ($p > 0,0001$) ja ER:n hyvin merkittävää ($p = 0,0028$). Kasvaimen reuna- ja sisäosien sisällä PR:n ilmeneminen oli kuitenkin osittain erittäin heterogeenistä, kun taas ER ja Ki-67 ilmenivät tasaisemmin.

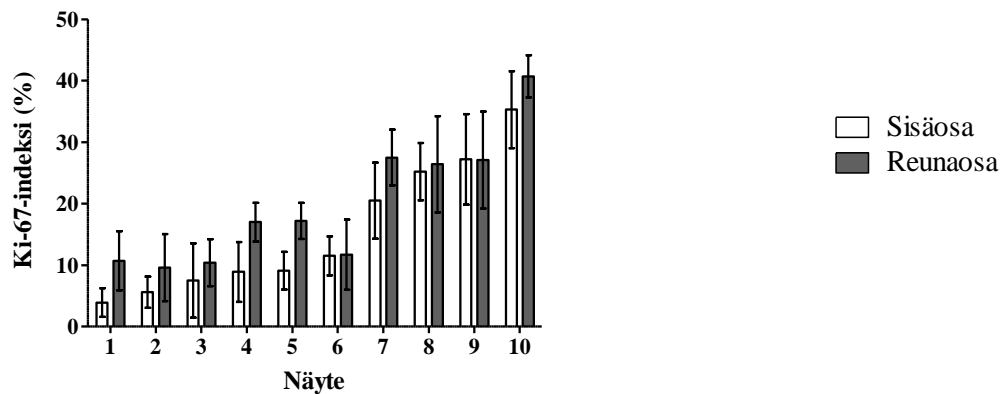
a.)



b.)



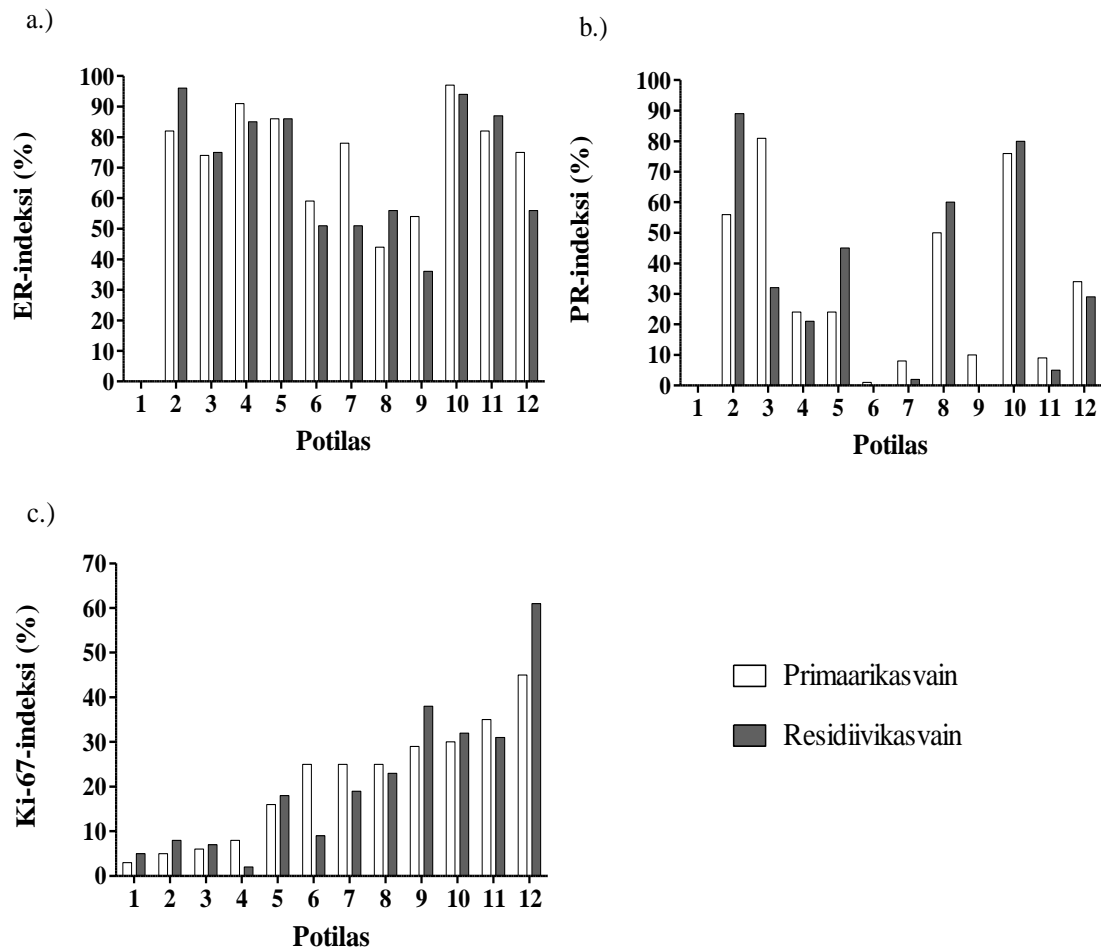
c.)



Kuva 20. ER:n, PR:n ja Ki-67:n heterogeenisyys. Suurten kasvainten reuna- ja sisäosien keskimääräiset a.) ER-, b.) PR- ja c.) Ki-67- indekset. Mittajانات kuvaavat reuna- ja sisäosien sisäisten indeksien keskihajontaa. ER:n Pearsonin korrelaatiokerroin reuna- ja sisäosien välillä oli 0,8332, PR:n 0,9802 ja Ki-67:n 0,9504.

4.6 Primaari- ja residiivikasvaimien hormonireseptori- ja Ki-67-statukset

Kokeessa mukana olleiden näyteparien diagnoosien väli oli keskimäärin 4,5 vuotta. Tutkimuksessa havaittiin, että potilaan residiivikasvaimen hormonireseptoristatus ja Ki-67-indeksi vastasivat primaarikasvaimesta määritettyjä arvoja (Kuva 21.). ER:n korrelaatio primaari- ja residiivikasvaimien välillä oli voimakkainta ($p < 0,0001$, $r = 0,9002$). Myös Ki-67:n ilmeneminen oli hyvin samanlaista primaari- ja residiivikasvainten välillä ($p < 0,0001$, $r = 0,8922$). PR:n status taas vaihteli enemmän, korrelaation ollessa kuitenkin merkittävää ($p = 0,0019$, $r = 0,7966$.)



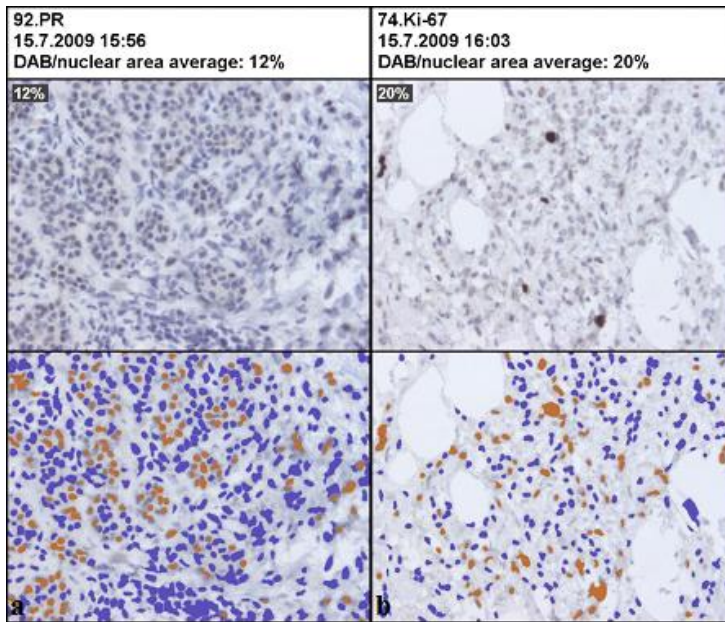
Kuva 21. ER-, PR- ja Ki-67-statusten vaihtelut primaari- ja residiivikasvainten välillä. 12 potilaan primaari- ja residiivikasvaimista määritetyt a.) ER-, b.) PR- ja c.) Ki-67-indeksit. Osa potilaiden näytteistä oli PR:n ja/tai ER:n suhteen täysin negatiivisia.

5. Tulosten tarkastelu

5.1 ImmunoRatio:n kalibrointi ja testaus

Tietokoneavusteiset analyysiohjelmat on kehitetty helpottamaan immunohistokemiallisesti värjättyjen rintasyövän kudoksenäytteiden analysointia. Jotta niiden analysoimat tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia, on osa ohjelmista, kuten myös ImmunoRatio, kalibroitava ennen varsinaisten näytteiden analysointia. Tässä tutkimuksessa kalibroitu ImmunoRatio analysoi testisarjan 50 kuvaa lähes moitteettomasti. Testisarjan korrelaatiokerroin 0,9732 ImmunoRatio:n ja manuaalisen analyysin välillä vastasi muiden analyysiohjelmien vastaavia korrelaatiokertoimia tai oli jopa niitä parempi (Mofidi ym., 2003; Rexhepaj ym., 2008; Faratian ym., 2009) Kalibroinnin onnistumisesta ja siten ImmunoRatio:n analyysien luotettavuudesta kertoo myös se, ettei kuvista tarvinnut rajata pois syöpäsolukkoon kuulumattomia komponentteja. Rajattujen kuvien tulokset eivät muuttuneet merkittävästi alkuperäisten kuvien tuloksista, mikä osoitti ImmunoRatio:n huomioivan analyyseissään pääasiassa vain syöpäsolujen tumat.

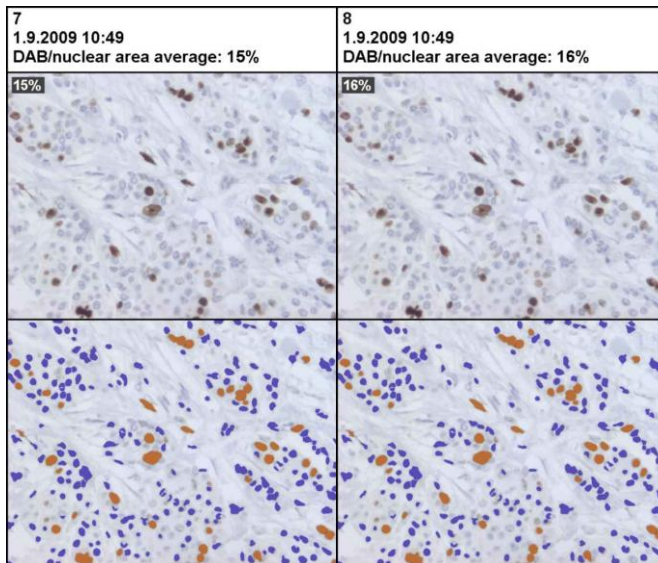
ImmunoRatio:n analysoimasta testisarjasta löytyi kuitenkin kaksi näytettä, joiden analyysit olivat selkeästi epäonnistuneita (Kuva 22.). Lisäanalyysien perusteella toinen näytteistä, PR-värjäys, analysoitui kuitenkin riittävän tarkasti. Näytteen epäonnistuneesti analysoidun testisarjan kuvan tumissa oli havaittavissa heikkoa ruskeutta, jonka ImmunoRatio oli luultavasti tunnistanut positiivisuudeksi (Kuva 22 a.). Toinen epäonnistunut näyte, Ki-67-värjäys, oli taas ongelmallisempi, sillä myöskään lisäanalyyseissä ImmunoRatio ei onnistunut analysoimaan siitä kuvattuja näkökenttiä oikein. Ki-67-värjäyksen lisäanalyyseissä huomattiin, että vain tietyltä alueelta näytteestä otetut kuvat analysoituivat virheellisesti (tuloksia ei esitetty). Suurin osa kudoksenäytteestä analysoitui siis täysin normaalisti. Syy virheelliseen tulokseen voi olla esimerkiksi näytteen epätasainen vastavärjäys, mikä taas voi johtua esimerkiksi näytteen epätasaisesta fiksaatiosta.



Kuva 22. Testisarjan näytteistä epäonnistuneet ImmunoRatio:n analyysit. A). PR-värjäys, b). Ki-67-värjäys. Käsien lasketut tulokset vastaaville näytteille olivat a). 2 % ja b). 2 %.

Epäonnistuneita analyyskejä on havaittu pienissä määrin myös muiden kuva-analyysiohjelmien yhteydessä, joten ilmiötä voidaan pitää täysin normaalina (Gokhale ym., 2007; Sharangpani ym., 2007). Tämän tutkimuksen aikana ImmunoRatio analysoi selkeästi väärin vain 4 kuvaa noin 1700 kuvasta, joten mistään yleisestä ongelmasta ei ollut kyse. Jos rutiinilyössä tulee vastaan epäonnistuneita analyyskejä, on näytteestä hyvä kuvata uusia näkökenttiä ja analysoida ne ImmunoRatio:lla. Jos analyysit eivät edelleenkään onnistu, täytyy näyte analysoida manuaalisesti.

Tietokoneavusteisten kuva-analyysiohjelmien yhtenä tärkeimpänä seikkana on pidetty niiden toistettavuutta eli ohjelmien kykyä analysoida näytteitä samalla tavalla kerrasta toiseen (Bernando ym., 2009). ImmunoRatio osoittautui tämän tutkimuksen mukaan toistettavuudeltaan erittäin luotettavaksi. Kolmesta näytteestä täsmälleen samalta kohdalta otetuista kymmenestä peräkkäisestä kuvasta vain yhden näytteen kohdalla tulos muuttui yhden prosenttiyksikön verran. Tämä muutos johtui ImmunoRatio:n tavasta tunnistaa negatiivisia tumia hieman erilailla peräkkäisistä kuvista (Kuva 23.). Syy tähän on kuvissa; jos yksikin pikseli on muuttunut edelliseen kuvaan verrattuna, voi ImmunoRatio tulkitä sen eritavalla. Havaittu yhden prosenttiyksikön muutos on kuitenkin niin teoriassa kuin käytännössäkin täysin mitätön.

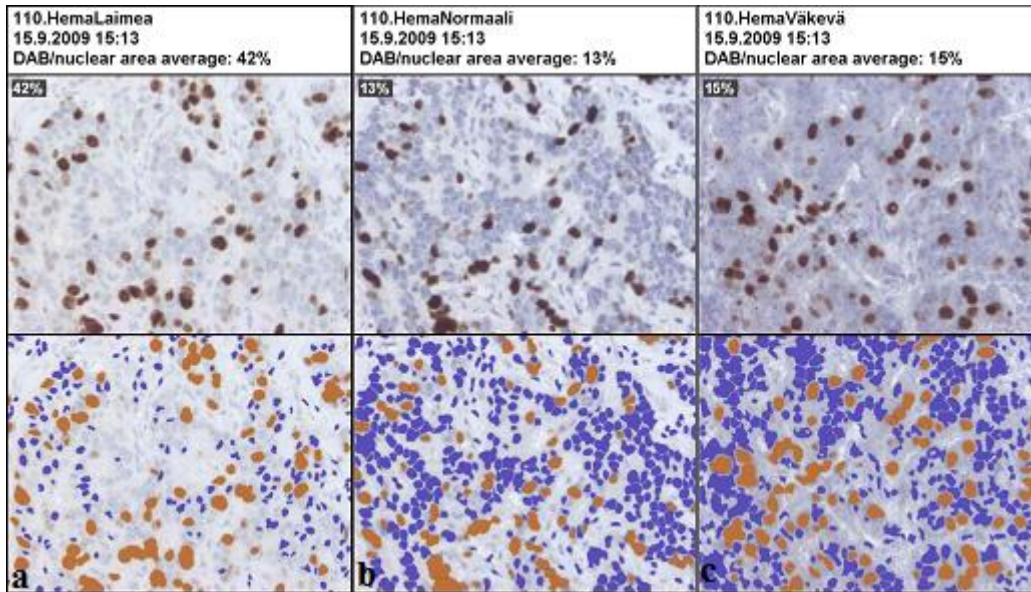


Kuva 23. Kahden peräkkäin otetun kuvan ImmunoRatio:n analyysit. Tulokset eroavat toisistaan prosenttiyksikön verran (15 % ja 16 %), sillä ohjelma on tunnistanut negatiivisia tumia hieman eritavoin.

5.2 Värjäystekniset seikat

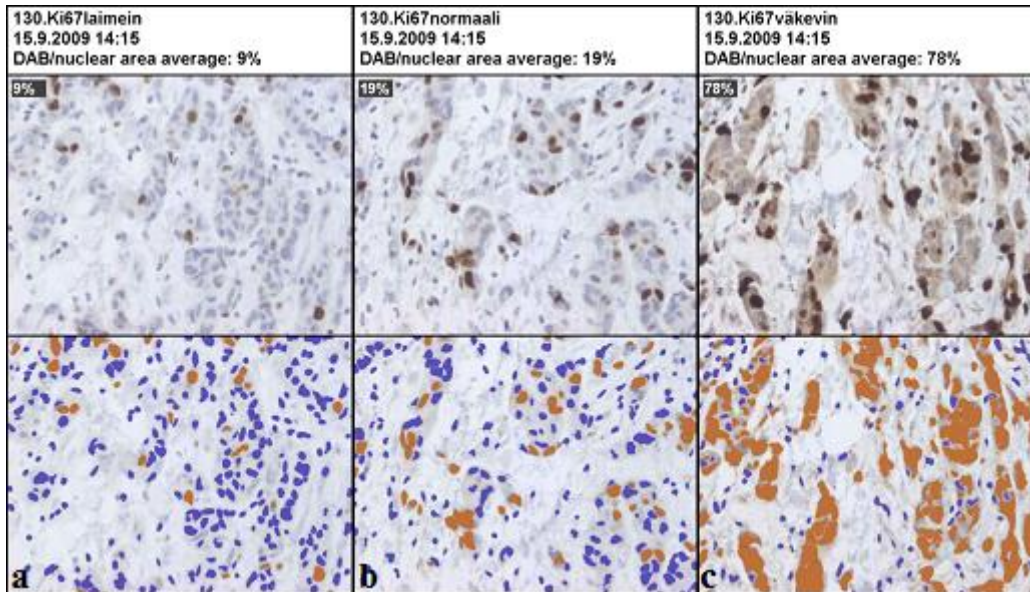
5.2.1 Värjäysten optimointi

Rintasyöpäkudosten immunohistokemiallisten värjäysten optimointi osoittautui tässä tutkimuksessa erittäin tärkeäksi seikaksi ImmunoRatio:n analyysiä ajatellen. Merkittävimmäksi tekijäksi värjäyksissä osoittautui näytteiden vastavärjäys eli hematoksyliinivärjäys. Vastavärjäyksen ehkä tärkein huomio oli ImmunoRatio:n heikko kyky tunnistaa vaalean sinisiä tumia. Jos hematoksyliinin pitoisuus oli liian alhainen tai vaikutusaika liian lyhyt, eivät tumat värjäytyneet riittävän tummiksi analyysiä ajatellen (Kuva 24 a.). Kokeen perusteella eri hematoksyliinit myös värjäivät näytteitä hieman eritavoin. Esimerkiksi Ventanan Hematoxylin I (Ventana Medical Systems) värjäsi hyvin herkästi näytteistä muitakin komponentteja kuin solujen tumia (Kuva 24 c.). Vastaavasti Ventanan Hematoxylin II (Ventana Medical Systems) ja Mayerin hematoksyliini (Oy FF-Chemicals Ab) värjäivät näytteistä tarkasti vain tumat. Näytteen syöpäsolukoon kuulumattomien komponenttien värjäytyminen hematoksyliinillä aiheutti ImmunoRatio:n analyysiin selkeitä virheitä (Kuva 24 c.). Täten ImmunoRatio:n analyysiä ajatellen optimaalisen vastavärjäyksen tulee olla riittävän tumma ja syöpäsolujen tumien on erotuttava taustasta selkeästi (Kuva 24 b.).



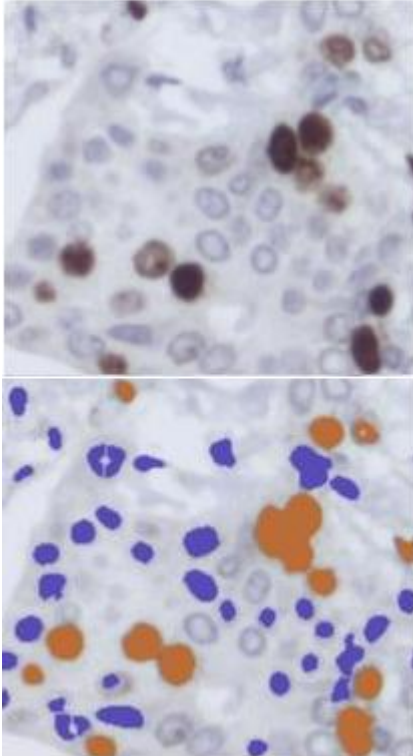
Kuva 24. Laimean ja väkevän hematoksyliinin vaikutus ImmunoRatio:lla analysoitaessa. Värjäyksissä on käytetty Ventanan Hematoxylin I:stä (Ventana Medical Systems). A.) Vastavärjäyksessä käytetty liian laimeaa hematoksyliiniä, jolloin ImmunoRatio ei tunnista vaaleansinisiä tumia, b.) optimaalinen hematoksyliinivärjäys värjää tumat riittävän tummasti ja tarkasti, c.) liian väkevällä hematoksyliinillä värjätty leike värjäytyy epätarkasti.

Kuten näytteiden vastavärjäyksellä, oli myös vasta-aineen pitoisuudella suora vaikutus ImmunoRatio:n analyysin onnistumiseen. Eri vasta-aineen pitoisuudet vaikuttivat ImmunoRatio:n analyysiin kuten erilaiset hematoksyliinivärjäykset (Kuva 25.). Eron näiden välillä oli kuitenkin se, että ImmunoRatio tunnisti kohtuullisen hyvin myös vaalean ruskeita tumia (Kuva 25 a.). Siten kokeen perusteella todettiin, että vasta-aineen laimennos voi hieman vaihdella tässä kokeessa optimaaliseksi todetun laimennoksen ympärillä. Tässä tutkimuksessa Ki-67 vasta-aineen (MM1, Novocastra) toimivaksi laimennoskaalaksi ImmunoRatio:ta ajatellen saatiin 1:50 – 1:200, kun optimaalinen laimennos oli 1:100 (Kuva 25 b.). Laimennosta 1:100 voitiin pitää optimaalisena, sillä kahden eri laboratorion Ki-67-värjäykset samoista näytteistä olivat lähes identtiset ja lisäksi kahdella eri Ki-67-vasta-aineen kloonilla (MIB-1, Dako ja MM1, Novocastra) tehdyt rinnakkaiset värjäykset samoista näytteistä vastasivat toisiaan lähes täydellisesti.



Kuva 25. Vasta-aineen pitoisuuden vaikutus ImmunoRatio:n analyysiin. Ki-67 –vasta-aineen (MM1, Novocastra) laimennosten vaikutus kudoksen värjäytymiseen ja siten ImmunoRatio:n analyysiin. Laimennokset: a.) 1:1000, tulos 9 %, b.) 1:100, optimaalinen, tulos 19 %) ja c.) 1:10 (tulos 78 %). Liian laimea tai väkevä vasta-aineen pitoisuus ei tuota värjäystä, jonka ImmunoRatio pystyi analysoimaan oikein.

Näytteiden värjäyksiin sekä hematoksyliinillä että vasta-aineella vaikuttaa myös näytteen esikäsittely ennen värjäystä. Samoilla hematoksyliinin tai vasta-aineen laimennoksilla voi saada erilaisia värjäyksiä myös näytteen esikäsittelyä muuttamalla. Täten myös esikäsittelyn optimointi värjäyksiä ajatellen on tärkeää, vaikka sitä ei tässä tutkimuksessa tarkasteltukaan. Lisäksi sekä manuaalinen että tietokoneavusteinen analyysi onnistuu parhaiten, jos rintasyöpäkudos on prosessoitu alusta asti oikein. Rintasyöpäkudoksen riittämätön fiksaatio voi johtaa näytteen epätasaiseen värjäytyvyyteen, mikä häiritsee näytteen analysointia. ImmunoRatio:n ongelmaksi tutkimuksen aikana ilmeni epätasaisesti värjäytyneiden tumien tunnistaminen (Kuva 26.) Kyseinen ilmiö, jossa tuman keskusta on lähes valkoinen ja väri on tarttunut siihen vain reunoilta, voi johtua esimerkiksi kudoksen riittämättömästä fiksaatiosta. Tällöin tumat voivat kärsiä ennen värjäystä suoritettavassa esikäsittelyssä, eivätkä ne enää värjydy normaalisti. Jos näytteessä on monia epätasaisesti värjäytyneitä tumia, on tärkeää kiinnittää huomiota ImmunoRatio:n analysoimaan tulokseen; sen täytyy olla järkeenkäypä.



Kuva 26. Epätasaisesti värjäytyneet tumat. ImmunoRatio ei tunnista aina oikein epätasaisesti värjäytyneitä tumia. Epätasainen värjäytyvyys saattaa johtua esimerkiksi kudoksen riittämättömästä fiksaatiosta, minkä vuoksi kudoksen prosessointi alusta asti on tärkeää luotettavien tulosten takaamiseksi. Ylhäällä muutama tuma alkuperäisestä kuvasta ja alhaalla samat tumat ImmunoRatio:n analysoimina.

5.2.2 Laboratorioiden ja värjäysautomaattien vertailu

Tämän tutkimuksen mukaan rintasyöpänäytteiden immunohistokemialliset värjäykset olivat yhteneväisiä kahden laboratorion välillä. Täten ImmunoRatio:n käyttöä ajatellen, näytteiden värjäysten suorittavalla laboratoriollla ei ole merkitystä. Tutkimuksessa havaitut pienet erot laboratorioiden välillä voivat johtua esimerkiksi käytetyistä värjäysautomaateista, sillä eri valmistajien laitteiden on todettu värjäävän näytteitä hieman eri herkkyyksillä (Arihiro ym., 2007). Värjäysautomaattien värjäyksiin vaikuttavat ennen kaikkea jo aiemmin mainittu vasta-aineen laimennos sekä myös sen vaikutusaika. Lisäksi laitekohtaisten reagenssien, kuten erilaisten kittien herkkyudet voivat olla erilaisia. Tässä tutkimuksessa kaikki kokeessa mukana olleet näytteet olivat kuitenkin esimerkiksi ER:n suhteen positiivisia kummassakin laboratoriossa, joten erot eivät olleet käytäntöä ajatellen merkittäviä.

Merkittävä huomio tutkimuksen aikana oli myös se, että ImmunoRatio analysoi onnistuneesti kolmen eri värjäysautomaatin (Autostainer; Labvision, Bond Max; Leica Microsystems, Benchmark XT; Ventana Medical Systems) värjäämiä näytteitä.

Käytetyissä automaateissa esimerkiksi hematoksyliinin sävy vaihteli hieman valmistajan mukaan, millä ei kuitenkaan todettu olleen vaikutusta ImmunoRatio:n kykyyn analysoida näytteitä.

5.2.3 ImmunoRatio:n ja värjäysautomaattien toistettavuus

Yhtenä tämän tutkimuksen tavoitteena oli vertailla sekä ImmunoRatio:n analyysien että värjäysautomaattien värjäyskertojen vaihtelua ja selvittää, kummalla on suurempi rooli näytteen tulosta ajatellen. Kuten jo mainittiin, sekä ImmunoRatio että värjäysautomaatit tekivät molemmat tarkkaa jälkeä, joten merkittävää vaihtelua ei tutkimuksessa havaittu kummassakaan muuttujassa. Teoriassa värjäysautomaatit ovat kuitenkin herkempiä systeemejä vaihtelulle johtuen yllä mainituista syistä.

5.3 Näytteiden kuvaaminen

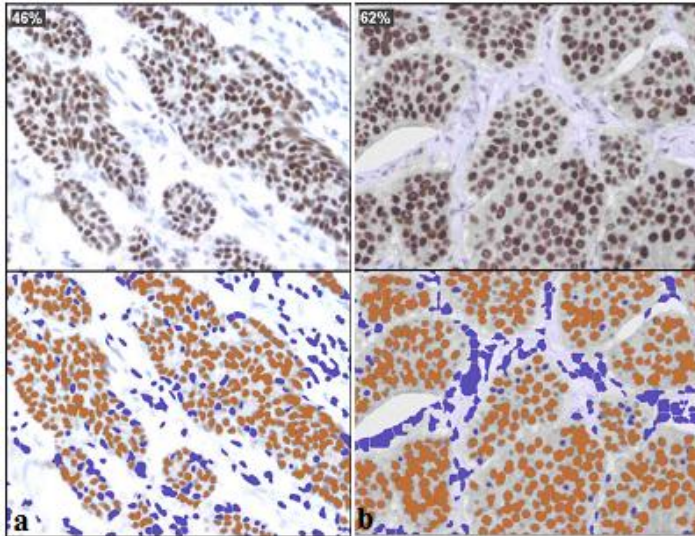
Tämän tutkimuksen mukaan ImmunoRatio:n käyttö ei vaadi näytteiden kuvaamiselta erityisiä toimenpiteitä. Riittäväksi kuvien lukumääräksi per kudosleike osoittautui kolme, mikä on selkeästi alhaisempi lukumäärä kuin käytettäessä esimerkiksi CM-2-analyysiohjelmaa. Tämän ohjelman kanssa on kuvattu yhdestä kudosleikkeestä jopa 20 - 40 näkökenttää (Biesterfeld ym., 1998). Toisaalta esimerkiksi Lehr ym. (1997) ja Gokhale ym. (2007) mukaan riittävä näkökenttien määrä per näyte on kolme tai neljä, jota tämä tutkimus myös tukee. Kuvien lukumäärän noustessa myös näytteen analysointiin käytettävä aika nousee, mitä voidaan rutiinistyössä pitää haittana.

Käyttäjät voi tämän tutkimuksen perusteella kuvata näytteet millä tahansa mikroskooppiin liitettävällä digitaalikameralla tai vaihtoehtoisesti virtuaalimikroskopialaitteistolla. Tätä on pidetty tärkeänä edellytyksenä kuva-analyysiohjelmien laaja-alaisen käytön takaamiseksi (Sharangpani ym., 2007). Vaikka tässä tutkimuksessa eri kameroiden tulokset poikkesivat joidenkin näytteiden kohdalla hieman toisistaan, ei eroja voitu pitää merkittävinä, sillä näkökentät oli kuvattu eri kameroilla hieman eri alueilta kudosleikkeiltä. Eri kameroita käytettäessä myös havaittiin, ettei kameroiden automaattisen valotuksen käyttö ole suositeltavaa, sillä tällöin taustakuvasta tulee liian tumma verrattuna näytteestä otettuun kuvaan. Tämän vuoksi on tärkeä muuttaa kuvausasetukset aina manuaaliselle säädölle.

Useissa kuva-analyysiohjelmia koskevissa tutkimuksissa on analysoitu vain yhdellä suurennoksella kuvattuja näkökenttiä (Lehr ym., 1997; Diaz ym., 2004; Sharangpani ym., 2007). Tässä tutkimuksessa ImmunoRatio analysoi onnistuneesti kuitenkin jopa kolmella eri suurennoksella kuvattuja kuvia. Tämä lisää edelleen käyttäjän mahdollisuuksia analysoida näytteitä omien tottumusten ja menetelmien mukaan. Näytteiden kuvaaminen kovin pienellä suurennoksella ei kuitenkaan ole suositeltavaa, sillä silloin näkökenttään jäävien syöpäsolukkaan kuulumattomien komponenttien osuus tuloksessa saattaa nousta merkittäväksi.

Tutkimuksen aikana ei optimaalisissa kuvaolosuhteissa havaittu kuvien laatuun liittyviä ongelmia, jotka olisivat haitanneet ImmunoRatio:n analyysijä. Jotkut kuva-analyysiohjelmat ovat tarkkoja kuvan laadun suhteen, minkä vuoksi kuvia on jouduttu muokkaamaan ennen analysointia (Sharangpani ym., 2007). Ainoat selkeästi kuvien laatuun ja siten ImmunoRatio:n analyysiin heikentävästi vaikuttaneet seikat olivat kuvan ylivalottuneisuus sekä liian heikko jpg-tiedoston laatu (Kuva 27.). Ylivalottuneissa kuvissa tumien muodot ja värit olivat jo niin vääristyneitä, ettei ImmunoRatio pystynyt analysoimaan niitä oikein (Kuva 27 a.). Toisaalta kuvan liian heikko valotus ei taas ollut ImmunoRatio:ta käytettäessä ongelma.

ImmunoRatio analysoi tämän tutkimuksen mukaan luotettavasti myös häviöllisellä pakkauksella (jpg) tallennettuja kuvia. Myös Sharangpani ym., (2007) ovat työssään analysoineet onnistuneesti jpg-tiedostoja. ImmunoRatio:n kyky analysoida myös jpg-tiedostoja nopeuttaa näytteiden analysointia, sillä jpg-tiedostot ovat pienen kokonsa vuoksi nopeampia käsitellä kuin esimerkiksi suuremmat tif-tiedostot. Samasta syystä myös tiedonsiirto ja arkistointi ovat jpg-tiedostojen kanssa yksinkertaisempia ja mielekkäämpiä. Jpg-tiedoston liian alhainen laatu eli kuvan tallennusvaiheen voimakas kompressio aiheuttaa kuitenkin kuvaan jo silmämääräisestikin havaittavia virheitä. Tällöin myös sen analysointi ImmunoRatio:lla on epäluotettavaa (Kuva 27 b.). Tässä tutkimuksessa jpg-tiedosto kooltaan noin 50 kilotavua analysoitui vielä oikein (vertaa tif-tiedosto: 4 081 kilotavua).



Kuva 27. ImmunoRatio:lle liian heikkolaatuiset kuvat analysoitavaksi. Kuvassa on esitetty sekä alkuperäinen kuva että ImmunoRatio:n analyysikuva. Kummastakin näytteestä on värjätty ER. a.) Ylivalottunut kuva, b.) liian alhaisella laadulla (10 %) tallennettu jpg-tiedosto.

5.4 ImmunoRatio rintasyövän tutkimustyössä

Kalibroitu ja kliiniseen diagnostiikkaan onnistuneesti validoitu ImmunoRatio osoittautui luotettavaksi apuvälineeksi myös rintasyövän tutkimustyössä.

5.4.1 ER:n, PR: ja Ki-67:n heterogeenisyys

Vaikka rintasyöpäkasvaimien on usein todettu ilmentävän esimerkiksi ER:ää epätasaisesti ympäri kasvainkudosta (Douglas-Jones ym., 2001; Chung ym., 2007), ei tässä tutkimuksessa havaittu heterogeenisyyttä tutkittujen antigeenien ilmenemisissä. PR:n ilmeneminen oli tosin paikoittain erittäin heterogeenistä, mutta silti samankaltaista sekä kasvaimien reuna- että sisäosissa. PR:n paikoittain heterogeeninen ilmeneminen on todettu myös muissa tutkimuksissa (Chung ym., 2007; Rexhepaj ym., 2008). Ki-67 ilmeni ER:n tapaan tasaisesti ympäri syöpäkudosta, mikä aikaisempien tutkimusten mukaan oli odotettavissakin (Kuenen-Boumeester ym., 1991). Tässä kokeessa ei ollut mukana basaalisia rintasyöpiä, joissa Ki-67:n on todettu ilmenevän voimakkaimmin kasvaimen reunaosissa (Livasy ym., 2006). Kokeessa oli muutenkin mukana vain 10 syöpäkasvainta ja jos näytekokonaisuus olisi ollut suurempi, olisi kirjallisuudessa mainittuja eroja antigeenien ilmenemisissä saattanut tulla enemmän esiin. Toisaalta on myös esitetty, että esimerkiksi ER:n voimakkaampi ilmeneminen kasvaimen reuna- kuin sisäosissa voi johtua kudoksen riittämättömästä fiksaatiosta. Tällöin kudospalan keskiosa on heikosti fiksoitunut eivätkä immunohistokemialliset värjäykset siellä onnistu. Lisäksi kasvaimen keskiosan nekroosi,

eli solujen ja kudoksen kuolio voi aiheuttaa kudoksen epätasaisen värjäytymisen (Chung ym., 2007).

5.4.2 ER, PR ja Ki-67 primaari- ja residivikasvaimissa

Tässä tutkimuksessa primaari- ja residivikasvainten välisissä ER-, PR- ja Ki-67 -statuksissa ei havaittu merkittäviä muutoksia, mikä tukee aikaisempia tutkimuksia (Hähnel ym., 1985; Gomez-Fernandez ym., 2008). Muutamissa tutkimuksissa on kuitenkin todettu varsinkin PR:n muuttuvan usein negatiiviseksi residivikasvaimessa (Lower ym., 2005). Tämä havaittiin myös tässä tutkimuksessa yhden näyteparin kohdalla. Tosin kyseisen parin primaarikasvaimen PR-status oli vain 10 %, joten sitäkin voidaan pitää niin sanottuna rajatapauksena positiivisuuden suhteen.

Ki-67-indeksin muuttumista primaari- ja residivikasvainten välillä ei ole tutkittu niin paljon kuin ER- ja PR-statuksien muutoksia. On kuitenkin esitetty, että Ki-67-indeksi olisi korkeampi residivikasvaimessa kuin vastaavan potilaan primaarikasvaimessa (Jensen ym., 2001). Samankaltaista ilmiötä ei tässä tutkimuksessa kuitenkaan havaittu, sillä indeksit primaari- ja residivikasvainten välillä olivat lähes samoja.

Kaiken kaikkiaan primaari-residiivi -parien määrä kokeessa oli suhteellisen pieni. Jos näytekoko olisi ollut suurempi, olisi tutkimuksessa saattanut ilmetä enemmän kirjallisuudessa mainittuja eroavaisuuksia kasvainten välillä. Tämän tutkimuksen mukaan primaarikasvaimen ER-, PR- ja Ki-67-statuksien avulla voidaan siis päätellä myös residivikasvainten vastaavat statukset. Täten uusiutuneesta rintasyöpäkasvaimesta ei välttämättä tarvitsisi samoja määrittämiä enää suorittaa.

5.5 Yhteenveto ja tulevaisuuden näkymät

Useiden muiden kuva-analyysiohjelmien tapaan myös ImmunoRatio osoittautui tässä työssä luotettavaksi ja käteväksi apuvälineeksi rintasyövän immunohistokemiallisten ER-, PR- ja Ki-67 – värjäysten analyysissä. Tässä tutkimuksessa korostui ennen kaikkea ImmunoRatio:n soveltuminen laaja-alaiseen käyttöön. Tätä voidaan pitää erittäin tärkeänä näytteiden objektiivisen ja tasalaatuisen analysoinnin takaamiseksi eri laboratorioissa. Kirjallisuudessa ei ilmennyt yhtään ainutta rintasyövän immunohistokemiallisten

värjäysten analysointiin tarkoitettua ohjelmaa, jota voisi käyttää Internetin välityksellä ja vielä ilmaiseksi.

ImmunoRatio:n käytössä ei ilmennyt suuria rajoituksia. Ohjelmalla analysoitiin onnistuneesti eri vasta-aineen klooneilla, eri värjäysautomaateilla ja eri laboratorioissa värjättyjä rintasyövän kudokset. Lisäksi immunohistokemiallisesti värjättyt näytteet kuvattiin erilaisilla kameroilla, mikroskoopin valotuksilla sekä suurennoksilla ja saadut kuvat tallennettiin tif-tiedostojen lisäksi myös jpg-tiedostoina.

Jos edellä mainitut seikat olivat käyttäjän omien mieltymysten mukaan muokattavissa, oli näytteen vastavärjäyksen taas oltava hyvin tarkka ja riittävän tumma. Lisäksi todettiin kudoksen huolellisen prosessoinnin olevan tärkeä edellytys luotettaville analyyseille. ImmunoRatio:n ongelmaksi osoittautuneet epätasaisesti värjäytyneet tumat voitaisiin luultavasti välttää fiksoimalla kudospalaa riittävästi.

Kliiniseen diagnostiikkaan validoitu ImmunoRatio toimi hyvin myös rintasyövän tutkimustyössä. Tämän tutkimuksen mukaan rintasyöpäkasvaimen heterogeenisyyden ei pitäisi olla ongelma suunniteltaessa potilaan hoitoa kasvaimen ER-, PR- ja Ki-67-statusten avulla. Lisäksi residivikasvaimen vastaavat statukset voitaisiin päätellä potilaan primaarikasvaimen avulla, jolloin residivikasvaimista ei immunohistokemiallisia määrityksiä tarvitsisi suorittaa.

Tietokoneavusteisten kuva-analyysiohjelmien, kuten ImmunoRatio:n täysautomatisointi vaatisi vielä ohjelman kykyä itse valita ja kuvata kudokset analysoitavat alueet. Toisaalta digitaalikameroiden kehityksen myötä myös niiden käyttö on yksinkertaistunut, joten manuaaliseen kuvaukseen ei mene käyttäjältä kauan aikaa. Tähän vaikuttaa oleellisesti myös kuvattavien näkökenttien määrä, joka tässä tutkimuksessa todettiin olevan suhteellisen pieni.

Näytteiden objektiivinen analysointi tietokoneavusteisilla ohjelmilla takaa värjäysten tasavertaisen tuloksen eri laboratorioissa. Jotta myös potilaiden hoito olisi tasavertaista laboratorioitten kesken, olisi tärkeää selvittää myös optimaaliset raja-arvot ER-, PR- ja Ki-67-värjäyksille. Samojen raja-arvojen käyttö eri laboratorioissa vaatii toisaalta immunohistokemiallisten värjäysten tarkkaa optimointia kussakin laboratoriossa. Tämän tutkimuksen kahden laboratorion välinen vertailu oli tässä suhteessa kannustava, sillä tulokset vastasivat toisiaan hyvin.

6. Lähdeluettelo

- Abboud, P., M. Lorenzato, D. Joly, C. Quereux, P. Birembaut & D. Ploton. 2008. Prognostic value of a proliferation index including MIB1 and argyrophilic nucleolar organizer regions proteins in node-negative breast cancer. *Am. J. Gynecol.* 199(2):146.e1-7.
- Arihiro, K., S. Umemura, M. Kurosumi, T. Moriya, T. Oyama, H. Yamashita, Y. Umekita, Y. Komoike, C. Shimizu, H. Fukushima, H. Kajiwara & F. Akyama. 2007. Comparison of evaluations for hormone receptors in breast carcinoma using two manual and three automated immunohistochemical assays. *Am. J. Clin. Pathol.* 127(3):356-65.
- Bacus, S.S., R. Goldschmidt, D. Chin, G. Moran, D. Weindberg & J.W. Bacus. 1989. Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. *Am. J. Pathol.* 135(5):783-92.
- Bardou, V.J., G. Arpino, R.M. Elledge, C.K. Osborne & G.M. Clark. 2003. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J. Clin. Oncol.* 15;21(10):1973-9.
- Barnes, D.M, W.H Harris, P. Smith, R.R. Millis & R.D. Rubens. 1996. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br. J. Cancer.* 74(9):1445-51.
- Bejar, J. E. Sabo, I. Misselevich, S. Eldar & J.H. Boss. 1998. Comparative study of computer-assisted image analysis and light-microscopically determined estrogen receptor status of breast carcinomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 122(4):346-52.
- Bernardo, V., S.Q. Lourenco, R. Cruz, L.H. Monteiro-Leal, L.E. Silva, D.R. Camisasca, M. Farina & U. Lins. 2009. Reproducibility of immunostaining quantification and description of a new digital image processing procedure for quantitative evaluation of immunohistochemistry in pathology. *Microsc. Microanal.* 15(4):353-65.
- Beucher, S. & F. Meyer. 1993. The morphological approach to segmentation: The watershed transformation. *Mathematical Morphology in Image Processing*. E. R. Dougherty, Ed. New York: Marcel Dekker, 12:433-481.
- Biesterfeld, S., D. Klüppel, R. Koch, S. Schneider, G. Steinhagen, A.M. Mihalcea & W. Schröder. 1998. Rapid and prognostically valid quantification of immunohistochemical reactions by immunohistometry of the most positive tumour focus. A prospective follow-up study on breast cancer using antibodies against MIB-1, PCNA, ER, and PR. *J. Pathol.* 185(1):25-31.
- Brown, R.W., D.C Allred, G.M. Clark, C.K. Osborne & S.G. Hilsenbeck. 1996. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin. Cancer. Res.* 2(3):585-92.
- Caly, M., P. Genin, A.A. Ghuzlan, C. Elie, P. Fréneaux, J. Klijanienko, C. Rosty, B. Sigal-Zafrani, A. Vincent-Salomon, A. Douggaz, M. Zidane & X. Sastre-Garau. 2004. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Res.* 24(5B):3283-8.
- Campbell, L.L. & K. Polyak. 2007. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cell or clonal evolution? *Cell Cycle.* 1;6(19):2332-8. Review.
- Castagnetta, L.A., A. Traina, M. Liquori, L. Marasà, R. Amodio, M. Di Falco, M. Miele, L. Rausa & G. Carruba. 1999. Quantitative image analysis of estrogen and progesterone receptors as a prognostic tool for selecting breast cancer patients for therapy. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 21(1):59-62.
- Cavaliere, A., E. Bucciarelli, A. Sidoni, G. Bianchi, N. Pietropaoli, V. Ludovini & R. Vitali. 1996. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer: comparison between enzyme immunoassay and computer-assisted image analysis of immunocytochemical assay. *Cytometry.* 15;26(3):204-8.
- Chang, J., T.J. Powles, D.C. Allred, S.E. Ashley, A. Makris, R.K. Gregory, C.K. Osborne & M. Dowsett. 2000. Prediction of clinical outcome from primary tamoxifen by expression of biologic markers in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 6(2):616-21.

- Charpin, C., P.M. Martin, B. Devictor, M.N. Lavaut, M.C. Habib, L. Andrac & M. Toga. 1988. Multiparametric study (SAMBA 200) of estrogen receptor immunocytochemical assay in 400 human breast carcinomas: analysis of estrogen receptor distribution heterogeneity in tissues and correlations with dextran coated charcoal assays and morphological data. *Cancer Res.* 15;48(6):1578-86.
- Charpin, C., L. Andrac, H. Vacheret, M.C. Habib, B. Devictor, M.N. Lavaut & M. Toga. 1988. Multiparametric evaluation (SAMBA) of growth fraction (monoclonal Ki67) in breast carcinoma tissue sections. *Cancer Res.* 1;48(15):4368-74.
- Charpin, C., J. Jacquemier, L. Andrac, H. Vacheret, M.C. Habib, B. Devictor, M.N. Lavaut & M. Toga. 1988. Multiparametric analysis (SAMBA 200) of the progesterone receptor immunocytochemical assay in nonmalignant and malignant breast disorders. *Am. J. Pathol.* 132(2):199-211.
- Charpin C., V. Secq, S. Giusiano, S. Carpentier, L. Andrac, M.N. Lavaut, C. Allasia, P. Bonnier & S. Garcia. 2009. A signature predictive of disease outcome in breast carcinomas, identified by quantitative immunocytochemical assays. *Int. J. Cancer.* 1;124(9):2124-34.
- Chung, G.G., M.P. Zerkowski, S. Ghosh, R.L. Camp & D.L. Rimm. 2007. Quantitative analysis of estrogen receptor heterogeneity in breast cancer. *Lab. Invest.* 87(7):662-9.
- Clahsen, P.C., C.J. van de Velde, C. Duval, C. Pallud, A.M. Mandard, A. Delobelle-Deroide, L. van den Broek & M.J van de Vijver. 1999. The utility of mitotic index, oestrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 25(4):356-63.
- Dettmar, P., N. Harbeck, C. Thomssen, L. Pache, P. Ziffer, K.Fizi, F. Jänicke, W. Nathrath, M. Schmitt, H. Graeff & K. Höfler. 1997. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br. J. Cancer.* 75(10):1525-33.
- Diaz, L.K., A. Sahin & N. Sneige. 2004. Interobserver agreement for estrogen receptor immunohistochemical analysis in breast cancer: a comparison of manual and computer-assisted scoring methods. *Ann. Diagn. Pathol.* 8(1):23-7.
- van Dierendonck, J.H., R. Keijzer, C.J. van de Velde & C.J. Cornelisse. 1989. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1;49(11):2999-3006.
- Domagala, W., M. Markiewski, B. Harezga, A. Dukowicz & M. Osborn. 1996. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin. Cancer Res.* 2(1):147-54.
- Douglas-Jones, A.G., N. Collett, J.M. Morgan & B. Jasani. 2001. Comparison of core oestrogen receptor (ER) assay with excised tumour: intratumoral distribution of ER in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 54(12):951-5.
- Dunnwald, L.K., M.A. Rossing & C.I. Li. 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 9(1):R6.
- Elledge, R.M., S. Green, R. Pugh, D.C. Allred, G.M. Clark, P. Ravdin, S. Martino & C.K. Osborne. 2000. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int. J. Cancer.* 20;89(2):111-7.
- Erdem, O., A. Dursun, U. Coskun & N. Günel. 2005. The prognostic value of p53 and c-erbB-2 expression, proliferative activity and angiogenesis in node-negative breast carcinoma. *Tumori.* 91(1):46-52.
- Faneyte, I.F., J.G. Schrama, J.L. Peterse, P.L. Remijnse, S. Rodenhuis & M.J. van de Vijver. 2003. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br. J. Cancer.* 10;88(3):406-12.
- Faratian, D., C. Kay, T. Robson, F.M. Campbell, M. Grant, D. Rea & J.M. Bartlett. 2009. Automated image analysis for high-throughput quantitative detection of ER and PR expression levels in large-scale clinical studies: the TEAM Trial Experience. *Histopathology.* 55(5):587-93.

- Fernö, M., C. Andersson, G. Fallenius & I. Idvall. 1996. Oestrogen receptor analysis of paraffin sections and cytosol samples of primary breast cancer in relation to outcome after adjuvant tamoxifen treatment. The South Sweden Breast Cancer Group. *Acta. Oncol.* 35(1):17-22.
- Furukawa, Y., I.I. Kimijima & R. Abe. 1998. Immunohistochemical Image Analysis of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Breast Cancer.* 25;5(4):375-380.
- Gasparini, G., P. Bevilacqua, F. Pozza, S. Meli, P. Boracchi, E. Marubini & J.R. Sainsbury. 1992. Value of epidermal growth factor receptor status compared with growth fraction and other factors for prognosis in early breast cancer. *Br. J. Cancer.* 66(5):970-6.
- Gerdes, J., U. Schwab, H. Lemke & H. Stein. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 15;31(1):13-20.
- Gokhale, S., D. Rosen, N. Sneige, L.K. Diaz, E. Resetskova, A. Sahin, J. Liu & C.T. Albarracin. 2007. Assessment of two automated imaging systems in evaluating estrogen receptor status in breast carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 15(4):451-5.
- Gomez-Fernandez, C., Y. Daneshbod, M. Nassiri, C. Milikowski, C. Alvarez & M. Nadji. 2008. Immunohistochemically determined estrogen receptor phenotype remains stable in recurrent and metastatic breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 130(6):879-82.
- Greene, G.L., C. Nolan, J.P. Enlger & E.V. Jensen. 1980. Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 77(9):5115-9.
- Haerslev, T., G.K. Jacobsen & K. Zedeler. 1996. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* 37(2):101-13.
- Hanley, K.Z., M.T. Siddiqui, D. Lawson, C. Cohen & A. Nassar. 2009. Evaluation of new monoclonal antibodies in detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and Her2 protein expression in breast carcinoma cell block sections using conventional microscopy and quantitative image analysis. *Diagn. Cytopathol.* 37(4):251-7.
- Harvey, J.M., G.M. Clark, C.K. Osborne & D.C. Allred. 1999. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 17(5):1474-81.
- Heidebrecht, H.J., F. Buck, K. Haas, H.H. Wacker & R. Parwaresch. 1996. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 29(7):413-25.
- Horii, R., F. Akiyama, Y. Ito & T. Iwase. 2007. Assessment of hormone receptor status in breast cancer. *Pathol. Int.* 57(12):784-90.
- Horwitz, K.B., Y. Koseki & W.L. McGuire. 1978. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology.* 103(5):1742-51.
- Horwitz, K.B., D.T. Zava, A.K. Thilagar, E.M. Jensen & W.L. McGuire. 1978. Steroid receptor analyses of nine human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 38(8):2434-7.
- Hähnel, R. & E. Twaddle. 1985. The relationship between estrogen receptors in primary and secondary breast carcinomas and in sequential primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* 5(2):155-63.
- Iacopetta, B., F. Grieru, B. Powell, R. Soong, K. McCaul & R. Seshardi. 1998. Analysis of p53 gene mutation by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism provides independent prognostic information in node-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4(7):1597-602.
- Jacquemier, J.D., F.M. Penault-Llorca, F. Bertucci, Z.Z. Sun, G.F. Houvenaeghel, J.A. Geneix, B.D. Puig, V.J. Bardou, J.A. Hassoun, D. Birnbaum & P.J. Viens. 1998. Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: a multiparametric and immunohistochemical analysis. *J. Pathol.* 184(2):130-5.
- Jalava, P., T. Kuopio, R. Huovinen, J. Laine & Y. Collan. 2005. Immunohistochemical staining of estrogen and progesterone receptors: aspects for evaluating positivity and defining the cutpoints. *Anticancer Res.* 25(3c):2535-42.

- Jansen, R.L., P.S. Hupperets, J.W. Arends, S.R. Joosten-Achjanie, A. Volovics, H.C. Schouten & H.F. Hillen. 1998. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*. 78(4):460-5.
- Jeltsch, J.M., Z. Krozowski, C. Quirin-Stricker, H. Gronemeyer, R. J. Simpson, J.M. Garnier, A. Krust, F. Jacob & P. Chambon. 1986. Cloning of the chicken progesterone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(15):5424-8.
- Jensen, E.V., G. Cheng, C. Palmieri, S.Saji, S. Mäkelä, S. Van Noorden, T. Wahlström, M. Warner, R.C. Coombes & J.A. Gustafsson. 2001. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 18;98(26):15197-202.
- Jonat, W., H. Maass & H.E. Stegner. 1986. Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res.* 46(8):4296-8.
- Kaplan, P.A., S.R. Frazier, T.S. Loy, A.A. Diaz-Arias, K. Bradley & J.T. Bickel. 2005. 1D5 and 6F11: An immunohistochemical comparison of two monoclonal antibodies for the evaluation of estrogen receptor status in primary breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 123(2):276-80.
- Kinsel, L.B., E. Szabo, G.L. Greene, J. Konrath, G.S. Leight & K.S. McCarty jr. 1989. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res.* 15;49(4):1052-6.
- Kostopoulos, S., D. Cavouras, A. Daskalakis, P. Bougioukos, P. Georgiadis, G.C. Kagadis, I. Kalatzis, P. Ravazoula & G. Nikiforidis. 2007. Colour-texture based image analysis method for assessing the hormone receptors status in breast tissue sections. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2007:4985-8.
- Kubbutat, M.H., G. Key, M. Duchrow, C. Schlüter, H.D. Flad & J. Gerdes. 1994. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J. Clin. Pathol.* 47(6):524-8.
- Kuennen-Boumeester, V., T.H. Van Der Kwast, H.A. Van Laarhoven & S.C. Henzen-Logmans. 1991. Ki-67 staining in histological subtypes of breast carcinoma and fine needle aspiration smears. *J. Clin. Pathol.* 44(3):208-10.
- Kuiper, G.G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson & J.A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 11;93(12):5925-30.
- Layfield, L.J., E.A. Saria, D.H. Conlon & B.J. Kerns. 1996. Estrogen and progesterone receptor status determined by the Ventana ES 320 automated immunohistochemical stainer and the CAS 200 image analyzer in 236 early-stage breast carcinomas: prognostic significance. *J. surg. Oncol.* 61(3):177-84.
- Layfield, L.J., D. Gupta & E.E. Mooney. 2000. Assessment of Tissue Estrogen and Progesterone Receptor Levels: A Survey of Current Practice, Techniques, and Quantitation Methods. *Breast J.* 6(3):189-196.
- Lehr, H.A., D.A. Mankoff, D. Corwin, G. Santeusano & A.M. Gown. 1997. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 45(11):1559-65.
- Lehr, H.A., C.M. van der Loos, P. Teeling & A. M. Gown. 1999. Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 47(1):119-26.
- Leong, F.J. & J.O. McGee. 2001. Automated complete slide digitization: a medium for simultaneous viewing by multiple pathologists. *J. Pathol.* 195(4):508-14.
- Lindboe, C.F. & S.H. Torp. 2002. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J. Clin. Pathol.* 55(6):467-71.
- Liu, S., S.M. Edgerton, D.H. Moore 2nd & A.D. Thor. 2001. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 7(6):1716-23.
- Livasy, C.A., G. Karaca, R. Nanda, M.S. Tretiakova, O.I. Olopade, D.T. Moore & C.M. Perou. 2006. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 19(2):264-71.
- van der Loos C.M. 2008. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 56(4):313-28.

- Lower, E.E., E.L. Glass, D.A. Bradley, R. Blau & S. Heffelfinger. 2005. Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res. Treat.* 90(1):65-70.
- Lundin, M., J. Lundin, H. Helin & J. Isola. 2004. A digital atlas of breast histopathology: an application of web based virtual microscopy. *J. Clin. Pathol.* 57(12):1288-91.
- du Manoir, S., P. Guillaud, E. Camus, D. Seigneurin & G. Brugal. 1991. Ki-67 labelling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry.* 12(5):455-63.
- Markiewicz, T., P. Wisniewski, S. Osowski, L. Patera, W. Kozłowski & R. Koktysz. 2009. Comparative analysis of methods for accurate recognition of cells through nuclei staining of Ki-67 in neuroblastoma and estrogen/progesterone status staining in breast cancer. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 31(1):49-62.
- Marrelli, D., E. Pinto, A. Neri, T. Megha, W. Gioffrè, T. Cioppa, G. De Marco, A. De Stefano & F. Roviello. 2006. Mib-1 proliferation index is an independent predictor of lymph node metastasis in invasive breast cancer: a prospective study on 675 patients. *Oncol. Rep.* 15(2):425-9.
- McClelland, R.A., P. Finlay, K.J. Walker, D. Nicholson, J.F. Robertson, R.W. Blamey & R.I. Nicholson. 1990. Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer Res.* 50(12):3545-50.
- Mofidi, R., R. Walsh, P.F. Ridgway, T. Crotty, E.W. McDermott, T.V. Keaveny, M.J. Duffy, A.D. Hill & N. O'Higgins. 2003. Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *Eur. J. Surg. Oncol.* 29(1):20-4.
- Mohsin, S.K., H. Weiss, T. Havighurst, G.M. Clark, M. Berardo, D. Roanh Ie, T.V. To, Z. Qian, R.R. Love & D.C. Allred. 2004. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod. Pathol.* 17(12):1545-54.
- Molino, A., R. Micciolo, M. Turazza, F. Bonetti, Q. Piubello, A. Corgnati, L. Sperotto, G. Martignoni, A. Bonetti, R. Nortilli, R. Castelli, S. Rodella, R. Capelli, E. Manfrin, G. Pelosi & G.L. Cetto. 1997. Estrogen receptors in 699 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res. Treat.* 34(3):221-8.
- Nadji, M., C. Gomez-Fernandez, P. Ganjei-Azar & A.R. Morales. 2005. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am. J. Clin. Pathol.* 123(1):21-7.
- Neri, A., D. Marrelli, C. Pedrazzani, S. Caruso, A. De Stefano, F. Mariani, T. Megha, G. De Marco, G. Corso, E. Pinto & F. Roviello. 2008. Prognostic relevance of proliferative activity evaluated by Mib-1 immunostaining in node negative breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 34(12):1299-303.
- Ogawa, Y., T. Moriya, Y. Kato, M. Oguma, K. Ikeda, T. Takashima, B. Nakata, T. Ishikawa & K. Hirakawa. 2004. Immunohistochemical assessment for estrogen receptor and progesterone receptor status in breast cancer: analysis for a cut-off point as the predictor for endocrine therapy. *Breast Cancer.* 11(3):267-75.
- Payne, S.J., R.L. Bowen, J.L. Jones & C.A. Wells. 2008. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology.* 52(1):82-90. Review.
- Pellikäinen, M.J., T.T. Pekola, K.M. Ropponen, V.V. Kataja, J.K. Kellokoski, M.J. Eskelinen & V.M. Kosma. 2003. p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. *J. Clin. Pathol.* 56(3):214-20.
- Pertschuk, L.P., K.B. Eisenberg, A.C. Carter & J.G. Feldman. 1985. Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies. Correlation with biochemistry and clinical endocrine response. *Cancer.* 55(7):1513-8.
- Pham, N.A., A. Morrison, J. Schwock, S. Aviel-Ronen, V. Iakovlev, M.S. Tsao, J. Ho & D.W. Hedley. 2007. Quantitative image analysis of immunohistochemical stains using a CMYK color model. *Diagn. Pathol.* 27:2:8.
- Pierga, J.Y., A. Leroyer, P. Viehl, V. Mosseri, S. Chevillard & H. Magdelénat. 1996. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 37(1):57-64.

- Pinder, S.E., P. Wencyk, D.M. Sibbering, J.A. Bell, C.W. Elston, R. Nicholson, J.F. Robertson, R.W. Blamey & I.O. Ellis. 1995. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br. J. Cancer*. 71(1):146-9.
- Press, M.F. & G.L. Greene. 1988. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Endocrinology*. 122(3):1165-75.
- Querzoli, P., G. Albonico, S. Ferretti, R. Rinaldi, E. Magri, M. Indelli & I. Nenci. 1996. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis. *J. Clin. Pathol.* 49(11):926-30.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.
- Reiner, A., B. Neumeister, J. Spona, G. Reiner, M. Schemper & R. Jakesz. 1990. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res.* 1;50(21):7057-61.
- Rexhepaj, E., D.J. Brennan, P. Holloway, E.W. Kay, A.H. McCann, G. Landberg, M.J. Duffy, K. Jirstrom & W.M. Gallagher. 2008. Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 10(5):R89.
- Rhodes, A., B. Jasani, D.M. Barnes, L.G. Bobrow & K.D. Miller. 2000. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J. Clin. Pathol.* (53):125-130.
- Ridler, T.W. & S. Calvard. 1978. Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Trans. Systems Man and Cybernetics*. 8(8):630-32.
- Rajo, M.G., G.B. García, C.P. Mateos, J.G. García & M.C. Vicente. 2006. Critical comparison of 31 commercially available digital slide systems in pathology. *Int. J. Surg. Pathol.* 14(4):285-305.
- Rudolph, P., H. Olsson, G. Bonatz, V. Ratjen, H. Bolte, B. Baldetorp, M. Fernö, R. Parwaresch & P. Alm. 1999. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol.* 187(2):207-16.
- Ruifrok, A.C. & D.A. Johnston. 2001. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 23(4):291-9.
- Ruifrok, A.C., R.L. Katz & D.A. Johnston. 2003. Comparison of quantification of histochemical staining by hue-saturation-intensity (HSI) transformation and color-deconvolution. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 11(1):85-91.
- Rüdiger, T., H. Höfler, H.H. Kreipe, H. Nizze, U. Pfeifer, H. Stein, F.E. Dallenbach, H.P. Fischer, M. Mengel, R. von Wasielewski & H.K. von Müller-Hermelink. 2002. Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am. J. Surg. Pathol.* 26(7):873-82.
- Seshardi, R., A.S. Leong, K. McGaul, F.A. Firgaira, V. Setlur & D.J. Horsfall. 1996. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *Int. J. Cancer.* 22;69(2):135-41.
- Sharangpani, G.M., A.S. Joshi, K. Porter, A.S. Deshpande, S. Keyhani, G.A. Naik, A.S. Gholap & S.H. Barsky. 2007. Semi-automated imaging system to quantitate estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in human breast cancer. *J. Microsc.* 226(Pt 3):244-55.
- Sklarew, R. J. & L.P. Pertschuk. 1987. Quantitation of the immunocytochemical assay for estrogen receptor protein (ER-ICA) in human breast cancer by television imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 35(11):1253-9.
- Spyratos, F., M. Ferrero-Poüs, M. Trassard, K. Hacène, E. Phillips, M. Tubiana-Hulin & V. Le Doussal. 2002. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer.* 15;94(8):2151-9.

- Starborg, M., K. Gell, E. Brundell & C. Höög. 1996. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 109 (Pt1):143-53.
- Stendahl, M., L. Rydén, B. Nordenskjöld, P.E. Jönsson, G. Lanbeg & K. Jirström. 2006. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 12(15):4614-8.
- Sternberg, S.R. 1983. Biomedical Image Processing. *IEEE Computer.* 16(1):22-34.
- Thor, A.D., S. Liu, D.H. Moore 2nd & S.M. Edgerton. 1999. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 17(2):470-7.
- Turbin, D.A., S. Leung, M.C. Cheang, H.A. Kennecke, K.D. Montgomery, S. McKinney, D.O. Treaba, N. Boyd, L.C. Goldstein, S. Badve, A.M. Gown, M. van de Rijn, T.O. Nielsen, C.B. Gilks & D.G. Huntsman. 2008. *Breast Cancer Res. Treat.* 110(3):417-26.
- Umemura, S., J. Itoh, H. Itoh, A. Serizawa, Y. Saito, Y. Suzuki, Y. Tokuda, T. Tajima & R.Y. Osamura. 2004. Immunohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer: which scoring system is suitable for highly sensitive procedures? *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 12(1):8-13.
- Urruticoechea, A. I.E. Smith & M. Dowsett. 2005. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1;23(28):7212-20.
- Viale, G., M.M. Regan, E. Maiorano, M.G. Mastropasqua, P. Dell'Orto, B.B. Rasmussen, J. Raffoul, P. Neven, Z. Orosz, S. Braye, C. Ohlschlegel, B. Thürlimann, R.D. Gerbel, M. Castiglione-Gertsch, K.N. Price, A. Goldhirsch, B.A. Gusterson & A.S. Coates. 2007. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J. Clin. Oncol.* 1;25(25):3846-52.
- Viale, G., A. Giobbie-Hurder, M.M. Regan, A.S. Coates, M.G. Mastropasqua, P. Dell'Orto, E. Maiorano, G. MacGrogan, S.G. Braye, C. Ohlschlegel, P. Neven, Z. Orosz, W.P. Olszewski, F. Knox, B. Thürlimann, K.N. Price, M. Castiglione-Gertsch, R.D. Gebler, B.A. Gusterson & A. Goldhirsch. 2008. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J. Clin. Oncol.* 1;26(34):5569-75.
- Wei, L.L., P. Hawkins, C. Baker, B. Norris, P.L. Sheridan & P.G. Quinn. 1996. An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* 10(11):1379-87.
- Wells, C.A., J.P. Sloane, D. Coleman, C. Munt, I. Amendoeira, N. Apostolikas, J.P. Bellocq, S. Bianchi, W. Boecker, G. Bussolati, C.E. Connolly, P. Dervan, M. Drijkoningen, I.O. Ellis, C.W. Elston, V. Eusebi, D. Faverly, P. Heikkilä, R. Holland, J. Jacquemier, M. Lacerda, J. Martinez-Penuela, C. De Miguel, J.L. Peterse, F. Rank, A. Reiner, E. Saksela, B. Sigal-Zafrani, M. Sylvan, B. Borisch, G. Cserni, T. Decker, H. Kerner, J. Kulka, P. Regitnig, A. Sapino, A.M. Tanous, S. Thorstenson & E. Zozaya. 2004. Consistency of staining and reporting of oestrogen receptor immunocytochemistry within the European Union--an inter-laboratory study. *Virchows. Arch.* 445(2):119-28.
- Wiesner, F.G., A. Magener, P.A. Fasching, J. Wesse, M.R. Bani, C. Rauh, S. Jud, M. Schrauder, C.R. Loehberg, M.W. Beckmann, A. Hartmann & M.P. Lux. 2009. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *Breast.* 18(2):135-41.
- Wintzer, H.O., I. Zipfel, J. Schulte-Mönting, U. Hellerich & S. von Kleist. 1991. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer.* 15;67(2):421-8.
- Yamashita, H., Y. Yando, M. Nishio, Z. Zhang, M. Hamaguchi, K. Mita, S. Kobayashi, Y. Fujii & H. Iwase. 2006. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 13(1):74-83.
- Zafrani, B., M.H. Aubriot, E. Mouret, P. De Crémoux, Y. De Rycke, A. Nicolas, E. Boudou, A. Vincent-Salomon, H. Magdelénat & X. Sastre-Garau. 2000. High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology.* 37(6):536-45.

Zhou, R., D.L. Parker & E.H. Hammond. 1992. Quantitative peroxidase-antiperoxidase complex-substrate mass determination in tissue sections by a dual wavelength method. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 14(2):73-80.