

Pro gradu -tutkielma

**Immunohistokemiallisten värjäysten digitaalinen
verifiointiarkisto patologian laboratorioon ja vasta-
aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointi**

Emmi Rimpioja



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

14.05.2023

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Master's Degree Programme in Cell and Molecular Biology

Rimpioja, Emmi Creation of a digital verification archive of immunohistochemical stainings for the pathology laboratory and the verification of Pit-1, SF-1 and T-Pit antibodies

MSci Thesis 35 p., 3 appendices (9 p.)

Supervisors: PhD, Medical Cell Biologist Mia Kero and Docent, Specialist in Pathology Teijo Kuopio

Inspectors: Professor Jari Ylänne and FM Hanna Elomaa

May 2023

Keywords: Adenoma, digital pathology, histology, pituitary gland, quality

Immunohistochemistry is a cost-effective and fast research method that is used, for example, in the diagnosis of cancer diseases, preparing a prognosis and evaluating the response to treatment in the pathology laboratory. Hundreds of antibodies are used in the diagnostic pathology laboratory. The function of an immunohistochemical antibody must be proven and documented, in other words verified, before using in the diagnostics. In this thesis, a digital verification archive was created on the server as a daily tool for pathologists and medical cell biologists. The indication and the staining pattern for each antibody can be checked from the archive. The most important diagnostic immunohistochemical antibody verification reports were updated in the digital archive, and the normal and tumor tissue verification glasses included in the reports were digitized using a microscope scanner. The verification archive was demonstrated in this thesis by verifying the new transcription factor antibodies Pit-1, SF-1 and T-Pit, intended for the diagnosis of glandular tumors (adenomas) originating from the cells of the anterior pituitary lobe. The antibodies are required by the current WHO classification of pituitary neuroendocrine tumors to establish an accurate diagnosis, and to distinguish cell types producing pituitary hormones. In this study, the SF-1 antibody was found to stain adenomas, that were expected to be stained only with the Pit-1 antibody. There are double-positive Pit-1 and SF-1 adenomas, but they are uncommon. Accurate classification of pituitary adenomas is important for patient monitoring and risk assessment.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
1.1	Laadunhallinta	1
1.1.1	Laadun ylläpitäminen ja jatkuva parantaminen	1
1.2	Immunohistokemia	2
1.2.1	Immunohistokemialliseen värjäykseen vaikuttavat tekijät	2
1.2.2	Primäärivasta-aineet ja klonalisuus	4
1.2.3	Immunohistokemialliset detektiomenetelmät	4
1.2.3.1	Avidiini-biotiinimenetelmä	5
1.2.3.2	Polymeeripohjaiset menetelmät	6
1.3	Digipatologia	7
1.3.1	Virtuaalimikroskopia	8
1.3.2	Digipatologian edut ja haasteet	8
1.4	Aivolisäke	9
1.4.1	Aivolisäkkeen etulohkon solutyypit ja histologia.....	10
1.4.2	Aivolisäkehormonit ja transkriptiofaktorit Pit-1, SF-1 ja T-Pit	11
1.4.3	Aivolisäkkeen adenoomat	13
1.5	Tutkielman tavoitteet	15
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	16
2.1	Verifiointiarkisto	16
2.2	Vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointi	18
2.2.1	Aineisto	18
2.2.2	Menetelmät.....	19
2.2.3	Vasta-aineen käyttöönotto ja verifiointiraportin laatiminen	20
3	TULOKSET	22
3.1	Verifiointiarkisto	22
3.2	Vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointi	22
4	TULOSTEN TARKASTELU	24
4.1	Verifiointiarkisto	24
4.2	Vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointi	25
5	PÄÄTELMÄT	28

KIRJALLISUUSLUETTELO	31
LIITE 1. PIT-1 -VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI.....	36
LIITE 2. SF-1 -VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI.....	39
LIITE 3. T-PIT -VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI	42

SANASTO JA LYHENTEET

Sanasto

Adenohypofyysi	Aivolisäkkeen etulohko
Neurohypofyysi	Aivolisäkkeen takalohko
Transkriptiofaktori	Transkriptiota säätelevä proteiini

Lyhenteet

ACTH	Kortikotropiini
FSH	Follikkeliä stimuloiva hormoni
GH	Kasvuhormoni
LH	Luteinisoiva hormoni
Pit-1	Pituitary specific POU class homeodomain transcription factor
PRL	Prolaktiini
SF-1	Steroidogenic factor 1
T-Pit	T-Box family member TBX19
TSH	Tyreotropiini

1 JOHDANTO

1.1 Laadunhallinta

Lääketieteellisten laboratorioden toimintaa ohjaa kansainvälinen SFS-EN ISO 15189 -standardi. Standardissa määritellään pätevyyttä ja laatua koskevat vaatimukset, jotka standardia noudattavan laboratorion tulee täyttää. (SFS-EN ISO 15189:2012). Myös HUS Diagnostiikkakeskus on akkreditoituna kliinisten kuvantamis- ja laboratoriopalveluiden tuottajana sitoutunut noudattamaan SFS-EN ISO 15189 -standardia. Standardi, HUS Diagnostiikkakeskuksen ohjeistus ja vastualueen yksikön oma ohjeistus ohjaavat laboratoriossa tehtävää diagnostiikkaa, tutkimusta ja kehitystyötä.

1.1.1 Laadun ylläpitäminen ja jatkuva parantaminen

Diagnostiikkakeskuksen tavoitteena on laadun jatkuva parantaminen. Laatua monitoroidaan Diagnostiikkakeskuksessa sekä sisäisesti, että ulkoisten toimijoiden kautta. Sisäiseen laadunarviointiin kuuluvat esimerkiksi sisäiset auditoinnit, sekä erilaiset arvioinnit, kyselyt ja koulutukset. Ulkoiseen laadunarviointiin puolestaan sisältyy muun muassa osallistuminen laadunarviointikierroksiin, joissa arvioidaan laboratorion kykyä täyttää sille asetetut laatuvaatimukset. Akkreditoinnin edellyttämien vaatimusten täyttymistä seurataan myös vuositasolla ulkoisten toimijoiden puolesta (Tani 2022).

Jatkuvaan parantamiseen kuuluu myös mahdollisten laatu-poikkeamien monitorointi ja hallinta. Poikkeamia voi ilmetä sekä laboratorioprosessissa, jossa solu- ja kudospäätteistä valmistetaan tulkittavia näytevalmisteita, että diagnostisessa prosessissa. Diagnostiseen prosessiin kuuluu solu- ja kudospäätteiden makroskooppinen ja mikroskooppinen analysoiminen, sekä johtopäätösten tekeminen näiden havaintojen pohjalta. Kaikki poikkeamat raportoidaan, ja niiden avulla pyritään kehittämään toimintaa entistä sujuvammaksi (Tani 2022).

1.2 Immunohistokemia

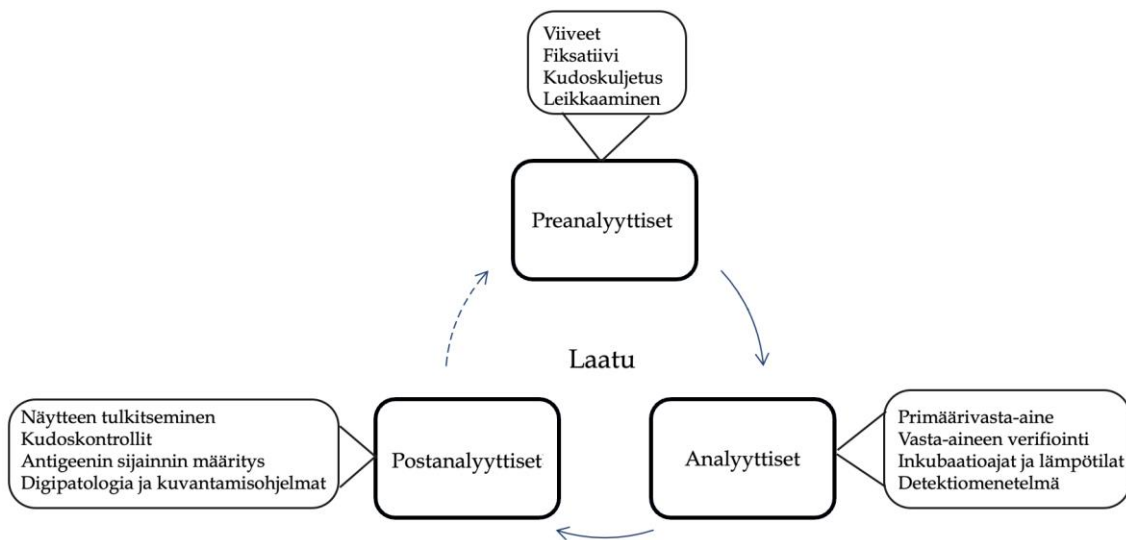
Immunohistokemia on menetelmä, jota käytetään diagnostiikan tukena histopatologisessa diagnostiikassa. Tekniikan toiminta perustuu antigeenien paikantamiseen ja visualisoimiseen soluista ja kudoksista vasta-aineiden avulla (de Matos ym. 2010, Magaki ym. 2019). Immunohistokemiaa hyödynnetään patologian erikoisalalla laajasti. Pääasiallinen painoarvo on syöpätautien diagnostiikassa, jossa immunohistokemian avulla voidaan selvittää kasvainten maligniteetti ja solutyypit, sekä etäpesäkkeen primäärinen lähde (Duraiyan ym. 2012). Immunohistokemiaa voidaan käyttää myös eri syöpätyyppien erotusdiagnoosiin ja hoitovasteen arvioimisessa (Bahrami ym. 2008). Prognoosia eli ennustetta taas voidaan laatia immunohistokemiallisten markkereiden avulla, joilla mitataan esimerkiksi proliferaatioindeksiä eli solujen jakautumisnopeutta, sekä paikantamalla kudoksesta tiettyjä kasvaimille ominaisia antigeenejä, onkogeenejä ja tuumorisuppressorigeenejä (solun jakautumista ja kasvua sääteleviä geenejä) (Duraiyan ym. 2012). Diagnostiikkaa varten immunohistokemiallisia markkereita pyydetään poikkeuksetta värjäyspaneelina, jonka perusteella voidaan päätellä vastauksia diagnostisiin kysymyksiin (Oien ja Dennis 2012).

Immunohistokemian etuja ovat nopeus, edullisuus, luotettavuus ja helppo toistettavuus. Laadukkaiden värjäystuloksen edellytyksenä on menetelmien verifiointi ja käytettyjen reagenssien toimivuuden varmistaminen (Lin ja Chen 2014, O'Hurley ym. 2014). Vasta-aineen toimivuus diagnostisessa käytössä varmistetaan verifiointin avulla. Verifiointin tarkoituksena on tuottaa dokumentoitua näyttöä siitä, että vasta-aine toimii siinä käyttötarkoituksessa, johon se ollaan ottamassa. Protokolla käydään läpi jokaisen käyttöön otettavan vasta-aineen kohdalla (Torlakovic ym. 2017). Tämä on erityisen tärkeää myös potilasturvallisuuden kannalta, eli oikean diagnoosin ja hoidon saamiseksi (Fitzgibbons ym. 2014).

1.2.1 Immunohistokemialliseen värjäykseen vaikuttavat tekijät

Immunohistokemialliset värjäykset ovat monivaiheisia prosesseja, joissa moni muuttuja voi vaikuttaa negatiivisesti värjäystuloksen laatuun ja luotettavuuteen

(Fitzgibbons ym. 2014). Tasaisen laadun edellytyksenä on värjäyksen, sekä sitä edeltävien ja seuraavien toimenpiteiden standardisointi. Immunohistokemiallisten värjäysten laatuun vaikuttavat parametrit voidaan jakaa kolmeen luokkaan: preanalyttisiin, analyttisiin ja postanalyttisiin tekijöihin (Kuva 1). Nämä muuttujat vaikuttavat värjäystulokseen prosessin eri vaiheissa (Lin ja Chen 2014).



Kuva 1. Immunohistokemiallisiin värjäyksiin vaikuttavat muuttujat voidaan jakaa kolmeen ryhmään (preanalyttiset, analyttiset ja postanalyttiset parametrit), jotka vaikuttavat tulosten laatuun prosessin eri vaiheissa.

Preanalyttiset muuttujat ovat tekijöitä, jotka vaikuttavat immunohistokemiallisen värjäyksen tulokseen ennen näytteen värjäämistä (Lin ja Chen 2014). Ensimmäinen tulokseen vaikuttava tekijä on kudoksen fiksaamista edeltävä viive, joka voi johtaa diagnostiikan kannalta tärkeiden proteiinien hajoamiseen. Käytetyn fiksatiivin pH, konsentraatio ja puskuriominaisuudet vaikuttavat myös kudoksen laatuun, minkä lisäksi vaikutusta on fiksaamiseen käytetyllä ajalla. Preanalyttisiin muuttujiin kuuluvat myös kudoskuljetuksessa käytettävät olosuhteet ja reagenssit. Kudoskuljetus on prosessi, jossa näytteestä poistetaan vesi, kudoksesta kirkastetaan ja siihen imeytetään parafiinia. Värjäyksen laatuun vaikuttaa myös kudosteiden leikkaamisen yhteydessä esimerkiksi mikrotomin puhtaudella, leikkaavan terän tyypillä ja terävyydellä sekä lämpötiloilla (Engel ja Moore 2011).

Analyttiset parametrit puolestaan ovat laatuun vaikuttavia muuttujia, jotka vaikuttavat suoraan immunohistokemialliseen värjäykseen. Näihin kuuluvat muun muassa primäärivasta-aineen valinta ja optimointi. Lopputulokseen vaikuttaa esimerkiksi valitun vasta-aineen kloni, ja onko kyseinen vasta-aine monoklonaalinen vai polyklonaalinen. Lisäksi vaikutusta on vasta-aineen laimennoksella, käytettävällä värjäyslaitteella, laaditun värjäysohjelman inkubaatioajoilla ja lämpötiloilla, sekä detektiomenetelmällä (Lin ja Chen 2014). Analyttisiin muuttujiin kuuluu olennaisena osana myös käytetyn vasta-aineen verifiointi (Fitzgibbons ym. 2014, Lin ja Chen 2014).

Postanalyttiset tekijät liittyvät näytteen tulkintaan värjäämisen jälkeen. Postanalyttisiä muuttujia ovat esimerkiksi kudoskontrollit, joiden avulla värjäyksen onnistuneisuutta arvioidaan, antigeenin sijainnin määrittäminen näytteestä ja näytteen tulkitseminen patologin toimesta (Lin ja Chen 2014). Kasvavana osana postanalyttisiä tekijöitä ovat myös digipatologia ja tekoälyä hyödyntävät kuva-analyysiohjelmat (Lin ja Chen 2014, Näpänkangas ja Tolonen 2019).

1.2.2 Primäärivasta-aineet ja klonalisuus

Kudosnäytteistä etsittävät antigeenit paikannetaan primäärivasta-aineen avulla, joka sitoutuu spesifisti suoraan kohdeantigeeniin. Vasta-aineen tunnistamaa antigeenin osaa nimitetään epitoopiksi. Vasta-aineet jaetaan niiden tuottamistavan perusteella monoklonaalisiin ja polyklonaalisiin (Ivell ym. 2014). Monoklonaaliset vasta-aineet sitoutuvat antigeenissä vain yhteen epitooppiin, mutta ovat affiniteetiltaan usein heikompia kuin polyklonaaliset vasta-aineet. Polyklonaaliset vasta-aineet taas ovat sensitiivisempiä, sillä ne tunnistavat kohdeantigeenistä useampia epitooppeja (Magaki ym. 2019). Tämän seurauksena voi esiintyä epäspesifiä värjäytymistä, eli vasta-aineen sitoutumista myös muihin epitooppeihin (Ivell ym. 2014).

1.2.3 Immunohistokemialliset detektiomenetelmät

Antigeeni paikannetaan näytteestä primäärivasta-aineen avulla, joka detektoidaan erilaisten detektiokittien avulla. Detektiolla tarkoitetaan prosessia, jossa

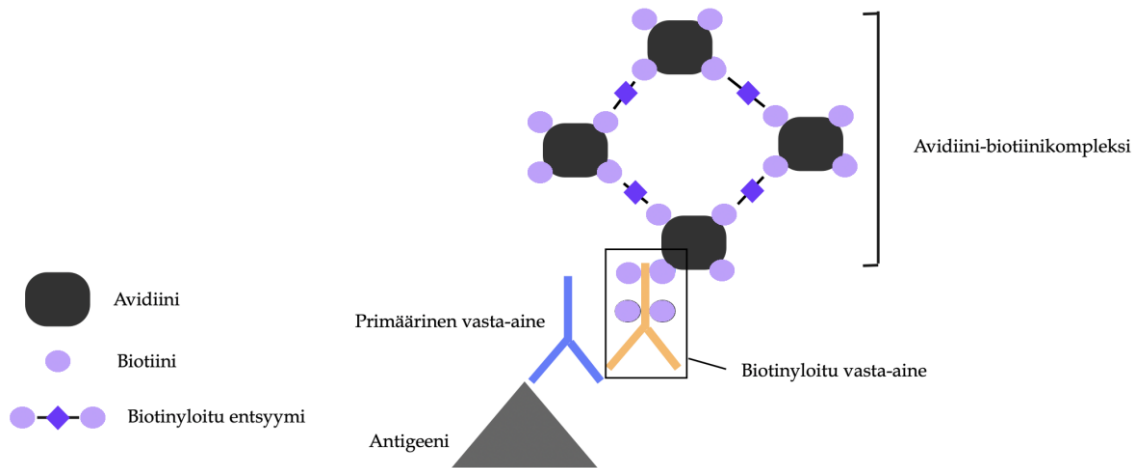
visualisoidaan antigeenin ja vasta-aineen sitoutuminen näytteessä (Magaki ym. 2019). Detektiokitit puolestaan ovat valmistajien tarjoamia paketteja, jotka sisältävät antigeenien detektioon tarvittavat reagenssit (Torlakovic ym. 2017). Tunnistaminen voi tapahtua suorasti tai epäsuorasti. Suorassa detektiomenetelmässä primäärivasta-aineeseen on sisällytetty merkkiaine, jonka avulla vasta-aineen ja antigeenin sitoutuminen nähdään mikroskoopissa. Epäsuorassa detektiossa primäärivasta-aineen ja antigeenin reaktio paikannetaan sekundäärisellä vasta-aineella, johon on liitetty merkkiaine. Epäsuora detektio on suoraa detektiota sensitiivisempi menetelmä, ja sen avulla voidaan havaita pieniäkin pitoisuuksia antigeeniä (Shojaeian ym. 2020).

Näytteen mikroskooppinen tulkinta edellyttää värireaktion muodostumista antigeeneihin sitoutuvissa vasta-aineissa. Värireaktio saadaan aikaan käyttämällä leimaa eli merkkiainetta. Detektiossa voidaan käyttää useita erilaisia merkkiaineita, kuten fluoresoivaa leimaa tai värireaktion aiheuttavia entsyymejä. Immunohistokemiassa käytettäviä entsyymejä ovat esimerkiksi piparjuuriperoksidaasi ja alkalinen fosfataasi. Entsyymit reagoivat kromogeenisten substraattien kanssa, mikä johtaa värireaktioon (Taylor ym. 2006). Yleisiä immunohistokemiassa käytettäviä kromogeenisiä leimoja ovat ruskean värireaktion aiheuttava DAB (diaminobentsidiini) ja punaisen värireaktion aiheuttava AEC (aminoetyylikarbatoli) (Nakata ja Suzuki 2012).

1.2.3.1 Avidiini-biotiinimenetelmä

ABC-menetelmä eli avidiini-biotiinimenetelmä on detektiometodi, jossa antigeenejä paikannetaan avidiini-biotiinikompleksin (Kuva 2) avulla. Menetelmässä primäärivasta-aineeseen liitetään biotiinilla konjugoitu sekundäärinen vasta-aine, johon entsyymeillä merkitty avidiini-biotiinikompleksi sitoutuu (Hsu ym. 1981). Yksi avidiinimolekyylille pystyy sitomaan itseensä neljä biotiinia. Tämä johtaa siihen, että avidiinit ja biotinyloidut entsyymit muodostavat suuria hilarakenteiden omaisia komplekseja. Suuret kompleksit kasvattavat detektion sensitiivisyyttä, ja ovat hyödyllisiä etenkin paikannettaessa pieniä määriä antigeeniä.

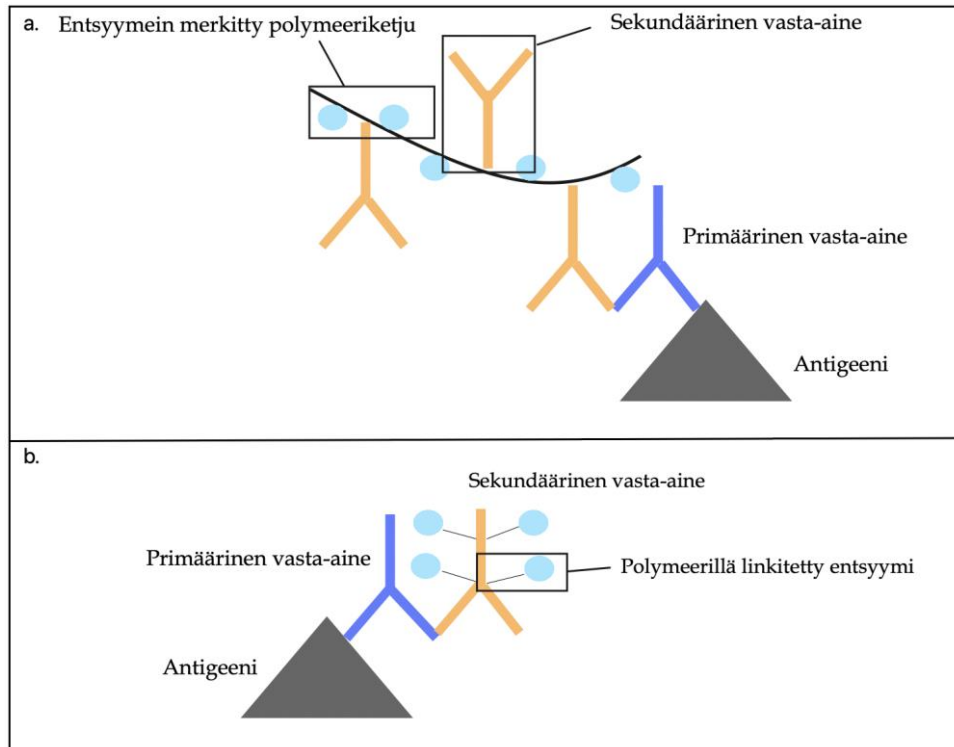
ABC-menetelmän heikkoutena on taustavärjäytymistä aiheuttava endogeeninen biotiini, jota ilmentyy kudoksissa luonnollisesti (Shojaeian ym. 2020).



Kuva 2. Avidiini-biotinidetektio. Menetelmässä antigeeni paikannetaan avidiini-biotiinikompleksin avulla. Kuva on muokattu Shojaeian ym. (2020) -luvun perusteella teoksessa *Immunohistochemistry – The Ageless Biotechnology*.

1.2.3.2 Polymeeripohjaiset menetelmät

Polymeeripohjaiset menetelmät ovat sensitiivisiä immunohistokemiallisia detektiomenetelmiä, joissa sekundääriset vasta-aineet liitetään polymeeriketjuun (Kuva 3a). Vasta-aineiden lisäksi polymeeriketjuun liitetään merkkiaineina toimivia entsyymejä. Tämä polymeeriketju puolestaan sitoutuu primäärivasta-aineeseen (Sabattini ym. 1998). Tekniikka on spesifimpi ja sensitiivisempi kuin ABC-metodi, mutta polymeerien suuri koko voi aiheuttaa haasteita esimerkiksi tumassa sijaitsevien antigeenien detektoimisessa. Multimeeritekniikkaa käyttävässä "toisen sukupolven" polymeeridetektiossa (Kuva 3b) käytetään polymeeriketjun sijaan multimeerimolekyylejä. Tällä tarkoitetaan sitä, että detektiossa käytettävä entsyymi liitetään suoraan vasta-aineeseen polymeerilinkin avulla. Polymeeriketjun poistaminen vähentää steeristä estettä, ja kasvattaa detektion sensitiivisyyttä (Shojaeian ym. 2020).



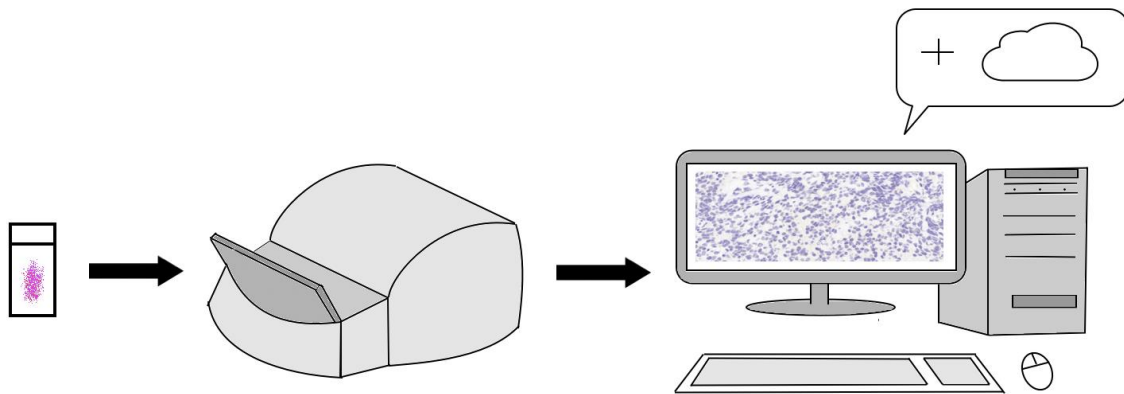
Kuva 3. Polymeeripohjaiset detektiomenetelmät: a) entsyymein merkittyä polymeeriketjua hyödyntävä detektiomenetelmä ja b) polymeerien avulla linkitettyjä entsyymejä hyödyntävä detektiomenetelmä. Kuva on muokattu Shojaean ym. (2020) -luvun perusteella teoksessa *Immunohistochemistry – The Ageless Biotechnology*.

1.3 Digipatologia

Digitalisaation yleistyminen terveydenhuollossa on kasvattanut tarvetta toimintatapojen päivittämiselle patologian laboratorioissa. Vastauksena tähän tarpeeseen on kehittynyt digitaalinen patologia eli digipatologia (Niazi ym. 2019). Merkitävä digipatologian osa-alue on virtuaalimikroskopia, eli potilasnäytelasien skannaaminen digitaaliseen muotoon mikroskooppiskannerin avulla, ja kuvien tulkitseminen tietokoneen ruudulta valomikroskoopin sijaan (Jahn ym. 2020). Tekoälyn soveltamista patologiaan tutkitaan myös aktiivisesti, sillä näytteiden skannaaminen mahdollistaa tekoälyn valjastamisen esimerkiksi diagnostiikan tueksi ja opetustyökaluksi (Niazi ym. 2019).

1.3.1 Virtuaalimikroskopia

Tekniikan kehittyminen on kahden viime vuosikymmenen aikana vauhdittanut virtuaalimikroskopian kehitystä, ja mahdollistanut laajemman käyttöönottamisen. Virtuaalimikroskopia voidaan jakaa kahteen prosessiin: näytteiden digitoimiseen ja tarkastelemiseen (Farahani ym. 2015). Digitoimista varten mikroskooppilasit skannataan mikroskooppiskannerilla. Skannaamiseen käytetään tarpeen mukaan joko 20x tai 40x objektiivia (Kumar ym. 2020). Skanneri ottaa näytteistä useita peräkkäisiä kuvia, joiden perusteella tietokone muodostaa korkearesoluutiosen kuvan näytteestä. Tämän jälkeen kuva tallennetaan tietokantaan, ja sitä voidaan tarkastella tietokoneen ruudulta tarkoitukseen kehitettyä ohjelmistoa hyödyntäen (Kuva 4) (Patel ym. 2021).



Kuva 4. Mikroskooppilasin digitoiminen. Puhdistettu näytelasi skannataan mikroskooppiskannerilla, ja lasista muodostettu kuva tallennetaan tietokantaan.

1.3.2 Digipatologian edut ja haasteet

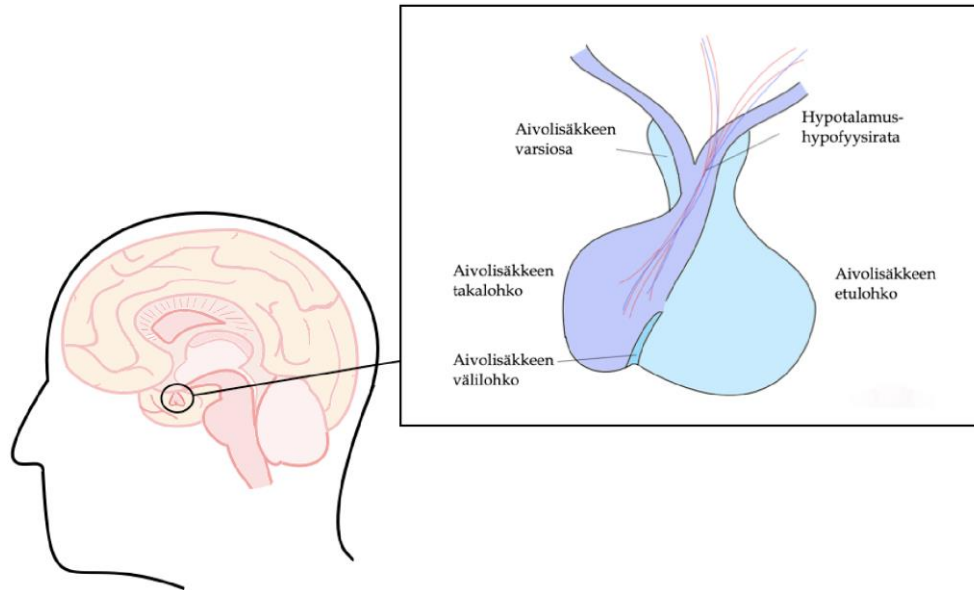
Digipatologialla on useita etuja perinteiseen patologiaan verrattuna. Digitaaliset näytteet helpottavat huomattavasti mikroskooppilasiens tarkastelemista esimerkiksi opetustilaisuuksissa ja kokouksissa, ja kuvia voidaan tarkastella samanaikaisesti useiden henkilöiden toimesta. Digitaaliset kopiot kuvista myös säilyvät paremmin kuin fyysiset lasit, eivätkä ne ole samalla tavalla alttiita rikkoutumiselle, värjäysten haalistumiselle tai katoamiselle (Turnquist ym. 2019). Tämän lisäksi digitoitujen näytteiden mahdollistavat tekoälyn käyttöön ottamisen ja kehittämisen patologian alan tarpeisiin sopivaksi (Farahani ym. 2015). Pitkällä aikavälillä digipatologia voi lisäksi olla kustannustehokkaampaa. Säästöjä tuottavat

esimerkiksi logistiikkaan, mikroskooppeihin ja mikroskooppilaseihin liittyvien kustannuksien aleneminen (Turnquist ym. 2019).

Digipatologiaan siirtymisessä on lukuisista hyödyistä huolimatta myös haasteita ja kuluja. Näitä ovat esimerkiksi digipatologian prosessien standardisoiminen ja validoiminen (Turnquist ym. 2019). Suuri haaste on lisäksi digitoitujen näytteiden vaatima tallennustila: kuvien tiedostokoot ovat suuria, ja vaativat paljon tallennustilaa (Abels ym. 2019). Digipatologia vaatii laajempaa käyttöön ottamista varten myös suuria alkuinvestointeja esimerkiksi skannereihin sekä niihin liittyviin kustannuksiin (muun muassa huoltokustannukset ja lisenssit), henkilökunnan kouluttamiseen ja tallennustilaan liittyen (Kumar ym. 2020).

1.4 Aivolisäke

Aivolisäke eli hypofyysi on endokriininen rauhanen, joka sijaitsee sellassa kitaluun ensimmäisessä syvennyksessä, keskellä väliaivojen pohjaa (Kuva 5), (Go ja Rajamohan 2017). Aivolisäke on noin herneen kokoinen, ja aikuisella sen paino vaihtelee noin puolesta grammasta yhteen grammaan (Sane 2010a, Ibinaiye ym. 2015). Rauhanen on keskimäärin suurempi miehillä kuin naisilla, mutta koko muuttuu iän ja kehon fysiologisen tilan mukaan (Sahni ym. 2006, Chapman ym. 2020).



Kuva 5. Aivolisäkkeen rakenne ja sijainti aivoissa. Kuva on muokattu Sane ym. (2010) lukua perusteella teoksessa *Endokrinologia*.

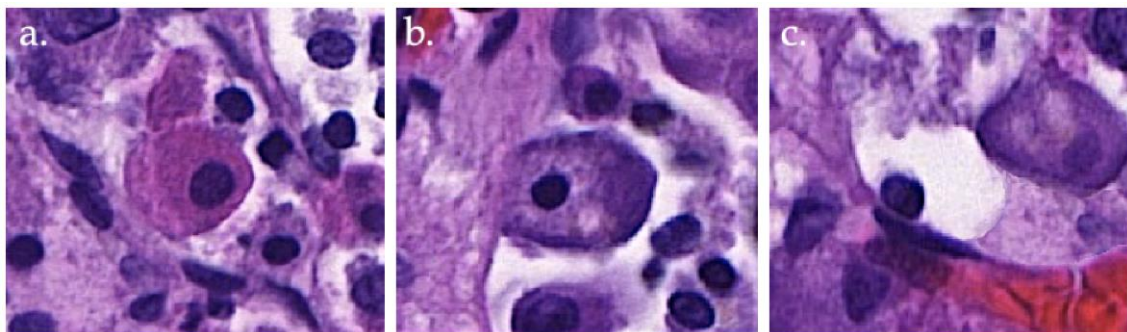
Aivolisäkkeen välilohko jakaa hypofyysin kahteen rakenteellisesti ja toiminnallisesti erilaiseen lohkoon: adenohypofyysiin eli aivolisäkkeen etulohkoon ja neurohypofyysiin eli aivolisäkkeen takalohkoon (Chapman ym. 2020) Etulohko muodostaa aivolisäkkeestä noin 80 %, ja sen rauhasissa tuotetaan aivolisäkehormoneja. Takalohko puolestaan varastoi hypotalamuksen erittämiä hormoneja (Sane 2010a). Se yhdistyy hypotalamukseen hypotalamus-hypofyysiradan kautta, joka sijaitsee aivolisäkkeen varressa (Haapasalo ym. 2012a).

1.4.1 Aivolisäkkeen etulohkon solutyypit ja histologia

Adenohypofyysin rauhasisolukko jakautuu viiteen solutyyppiin: prolaktiinia, kasvuhormonia, tyreotropiinia, kortikotropiinia ja gonadotropiineja erittäviin soluihin. Kasvuhormonia (GH) tuottavia soluja eli somatotrooppeja on adenohypofyysin soluista määrällisesti eniten, noin 40–50 %. Kortikotropiinia (ACTH) erittävät kortikotroopit edustavat noin viidesosaa rauhasoluista, kun taas prolaktiinia (PRL) tuottavat laktotroopit muodostavat adenohypofyysin rauhasolukosta noin 15 %. Gonadotrooppeja, eli luteinisoivaa hormonia (LH) ja follikkelia stimuloivaa hormonia (FSH) tuottavaa solutyyppejä, on adenohypofyysin rauhasoluista 10–15 %. Tyreotropiinia (TSH) erittävät tyreotroopit muodostavat

aivolisäkkeen etulohkon rauhasoluista noin 5 %, ja ovat määrällisesti vähiten ilmennetty soluryhmä. Kutakin solutyyppeä ilmentävät rauhaset ryhmittyvät aivolisäkkeessä alueittain, pois lukien gonadotropiineja erittävät rauhaset, jotka jakautuvat tasaisesti koko etulohkon alueelle (Sane 2010a).

Hematoksyliini-eosiini (HE) -värjäys on tärkeä diagnostinen työkalu, jonka perusteella aivolisäkkeen etulohkosta voidaan erottaa kolmenlaisia rauhasoluja: asidofiilejä, basofiilejä ja kromofobeja (Kuva 6) (Al-Brahim ja Asa 2006). Somatotroopit ja laktotroopit ovat asidofiilisiä soluja, ja niiden sytoplasma värjäytyy punaisella tai oranssilla. Tyreotroopit, gonadotroopit ja kortikotroopit puolestaan ovat basofiilisiä soluja, joiden sytoplasma värjäytyy violetiksi tai sinertäväksi. Kromofobiset solut eivät sisällä hormoneja, ja niiden sytoplasma näkyy HE-värjyksessä valkoisena. Kromofobisia soluja ovat esimerkiksi hormoninsa erittäneet solut tai erilaistumattomat kantasolut (Ilahi ja Ilahi 2021).

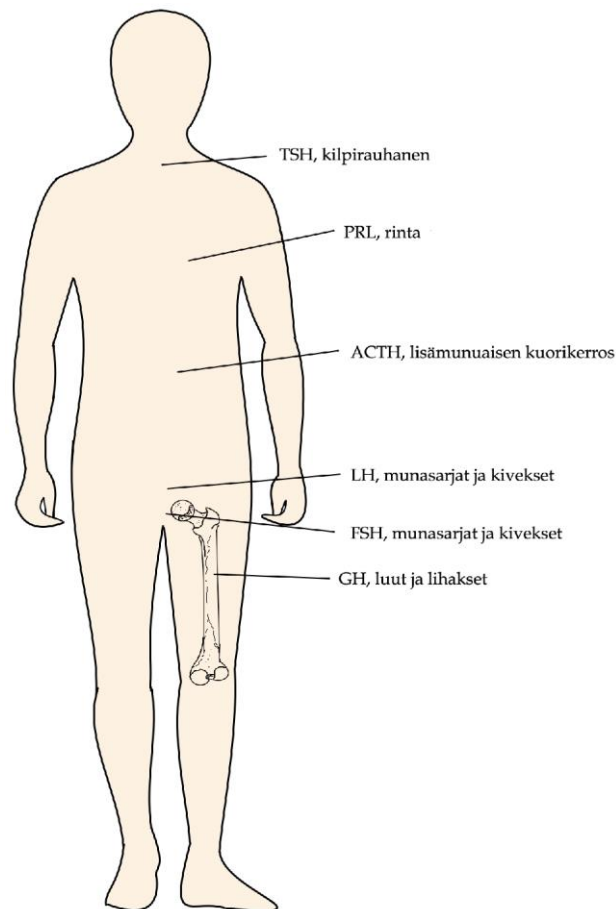


Kuva 6. Aivolisäkkeen etulohko, HE-värjäys (40x-suurennos). Kuvapaneeliin on merkitty aivolisäkkeen eri rauhasolutyypit: asidofiilit (a), basofiilit (b) ja kromofobiset solut (c). Solujen tumat värjäytyvät tumman siniseksi tai violetiksi.

1.4.2 Aivolisäkehormonit ja transkriptiofaktorit Pit-1, SF-1 ja T-Pit

Aivolisäkehormoneilla on tärkeä rooli elimistön homeostasian säätelyssä. Niiden avulla säädellään esimerkiksi useimpia endokriinisiä rauhasia ja vaikuttaa lukuksiin elimistön toimintoihin (Kuva 7) (Perez-Castro ym. 2012). Prolaktiini edistää yhteistyössä muiden hormonien kanssa laktaatiota, eli maidon eritystä rintarauhasista. Kasvuhormoni on keskeisessä osassa pituuskasvussa, ja vaikuttaa osaltaan metabolisiin reaktioihin. Tyreotropiini aktivoi kilpirauhasen hormoni tuotantoa, kun taas kortikotropiini aktivoi ja ylläpitää steroidisynteesiä

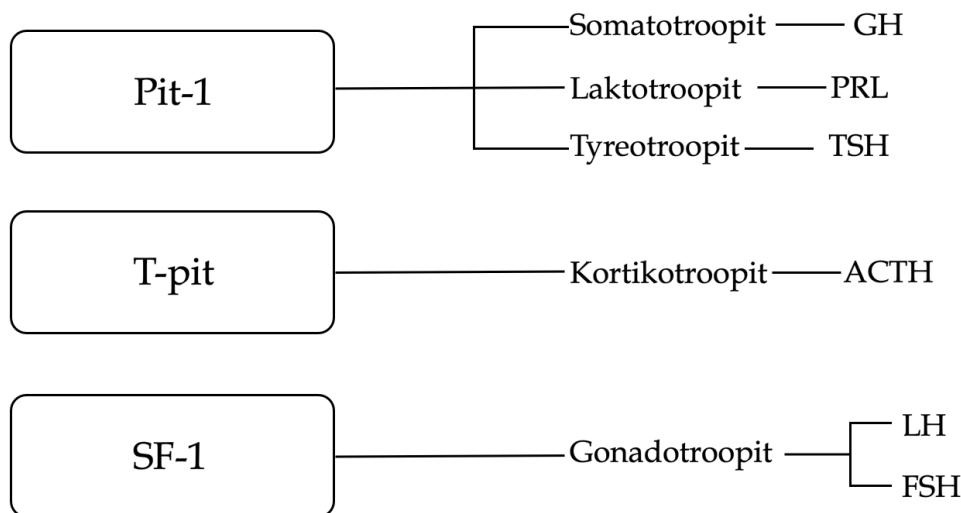
lisämunuaisen kuorikerroksessa. Luteinisoiva hormoni ja follikkelia stimuloiva hormoni säätelevät naisilla munasolujen kypsymistä ja munasarjojen hormoni-tuotantoa. Miehillä luteinisoiva hormoni aktivoi testosteronisynteesiä ja follikkelia stimuloiva hormoni puolestaan aktivoi spermatogeneesiä (Sane 2010a). Neurohypofyysi ei tuota hormoneja, mutta se varastoi ja erittää hypotalamuksen syntetisoimaa oksitosiinia (OT) ja antidireettista hormonia (ADH) (Haapasalo ym. 2012a).



Kuva 7. Adenohypofyyysin hormonit ja niiden vaikutuksen kohteena olevat elimet ja kudokset. Kuvan lähteenä on käytetty Sane ym. (2010a) lukua teoksessa *Endokrinologia*.

Aivolisäkkeen transkriptiofaktorit puolestaan ovat alkionkehitystä ohjaavia proteiineja, joiden ajankohtaan sidottu ekspressio, sekä vuorovaikutus DNA:n ja koaktivaattorien kanssa johtaa hypofyyysin normaaliin kehitykseen (De Moraes ym. 2012). SF-1 (steroidogenic factor 1) transkriptiofaktoria ilmennetään gonadotrooppisen linjan soluissa, ja sen ekspressio johtaa LH:ta ja FSH:ta erittävien

solujen erilaistumiseen alkionkehityksessä (Kuva 8). SF-1 ilmenee aivolisäkkeen lisäksi lisääntymiselimissä ja lisämunuaisissa (Burcea ym. 2021). Pit-1 (pituitary specific POU class homeodomain transcription factor) on yksinomaan aivolisäkkeessä ilmentyvä transkriptiofaktori, joka kuuluu POU-homeodomain -perheeseen. Pit-1 on välttämätön transkriptiofaktori somatotrooppisen, laktotrooppisen ja tyreotrooppisen solutyypin kehittymiselle. Nämä solutyypit erittävät aivolisäkkeen etulohkon hormoneita GH, PRL ja TSH (Kuva 8). T-Pit (T-Box family member TBX19) kuuluu T-Box transkriptiofaktoriperheeseen. Sen aktivaatio alkionkehityksessä johtaa ACTH-hormonia erittävien kortikotrooppisolujen kehittymiseen aivolisäkkeen etulohkossa (Kuva 8) (Kelberman ja Dattani 2006).



Kuva 8. Aivolisäkkeen transkriptiofaktoreista Pit-1, T-Pit ja SF-1 erilaistuvat solutyypit, ja näiden solutyypin erittämät hormonit. Kuvan lähteenä on käytetty Burcea ym. (2021) -artikkelia.

1.4.3 Aivolisäkkeen adenoomat

Adenoomat ovat yleisimpiä aivolisäkkeen kasvaimia. Ne muodostuvat pääosin yhdestä solutyypistä, ja ilmentävät samaa hormonia, jota kyseinen solutyypin erittää aivolisäkkeessä (Sane 2010b). Joissain tapauksissa tuumori voi erittää useampaa hormonia. Tällöin puhutaan plurihormonaalisista adenoomista (Allehaibi ym. 2021). Toimimattomat adenoomat (eng. non-functioning adenoma) ja nollasolutadenoomat (eng. null cell adenoma) eroavat hormonaalisesti

aktiivisista adenoomista siten, että ne eivät ilmennä ollenkaan aivolisäkehormoneita (Picó ym. 2021). Adenoomakasvaimet voivat oireilla monella tapaa: tuumorit voivat aiheuttaa endokrinologisia oireita, kuten hormonien liikaeritystä tai hormonipuutoksia (Metso ym. 2017). Endokrinologisten oireiden lisäksi tuumorit voivat kasvaessaan aiheuttaa neurologiasia oireita, kuten päänsärkyä, muutoksia näkökentässä tai epileptisiä kohtauksia (Haapasalo ym. 2012b, Metso ym. 2017). Aivolisäkkeen adenoomien diagnosoinnissa on mukana moniammatillinen erikoissairaanhoidon tiimi. Diagnostiikan työkaluja ovat magneettikuvaus, verestä tehtävät hormonitutkimukset, immunohistokemialliset hormonivärjäykset ja näkökenttätutkimukset (Metso ym. 2017, Sen ym. 2017). Pääasiallinen hoitokeino hormonaalisesti aktiivisille ja suurikokoisille epäaktiivisille kasvaimille on kirurginen poistaminen. Toissijaisena hoitokeinona on sädehoito ja joissain tapauksissa myös lääkehoito (Lindholm ym. 2017).

Aivolisäkkeen adenoomia on perinteisesti luokiteltu immunohistokemiallisten hormonivärjäysten perusteella (Saeger ym. 2007). Diagnostiikan tarkkuuden parantamiseksi WHO:n (World Health Organization) endokriinisten ja neuroendokriinisten kasvainten luokittelun 5. painoksessa (2022) suositeltiin aivolisäkkeen adenoomien diagnostiseen immunohistokemiallisten värjäysten paneeliin lisättäväksi transkriptiofaktoreita Pit-1, SF-1 ja T-Pit (Lopes 2017, Asa ym. 2022). Esimerkiksi toimimattomat adenoomat pystytään transkriptiofaktorivärjäysten avulla erottamaan nollasoluadenoomista; toimimattomat adenoomat ilmentävät Pit-1, SF-1 ja T-Pit -markkereita, kun taas nollasoluadenoomat eivät (Picó ym. 2021, Silva-Ortega 2021). Diagnostiikan kannalta näiden kahden adenoomatyyppin erottaminen toisistaan on tärkeää, koska nollasoluadenoomien on todettu olevan toimimattomia adenoomia aggressiivisempia (Drummond ym. 2019, Haddad ym. 2020). Tarkka luokittelu on keskeistä muidenkin adenoomien täsmällisen diagnostiikan varmistamiseksi, sekä oikean hoitomuodon valitsemisen ja potilaiden seurannan kannalta (Silva-Ortega ym. 2021).

1.5 Tutkielman tavoitteet

Tässä tutkielmassa oli tavoitteena luoda yhdenmukaistettu digitaalinen verifiointiarkisto Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) Diagnostiikkakeskuksen Patologian osaston diagnostisten immunohistokemiallisten vasta-aineiden verifiointiraporteista. Verifiointiarkisto tehtiin täydentämään edeltävää arkistointimenetelmää, joka muodostui mappeihin säilötyistä paperisista verifiointiraporteista ja raporttikohtaisista verifiointinäytelaseista. Digitoidulla arkistolla on useita etuja perinteiseen arkistointimenetelmään verrattuna. Digitoidut dokumentit ovat saatavilla usealle henkilölle yhtä aikaa eri sijainneissa, mikä lisää tehokkuutta ja joustavuutta. Lisäksi digitointi mahdollistaa immunohistokemiallisten värjäysten säilymisen paremmin, sillä fyysisillä laseilla on taipumus haalistua ja tummua ajan myötä. Merkittävä etu on myös se, että digitoidut näytelasit eivät pääse rikkoutumaan, ja dokumentit ja näytelasit ovat turvassa häviämislähteen suuressa laboratoriossa. Arkisto suunnattiin opetusmateriaaliksi erikoistuville patologeille ja sairaalalubiologeille, sekä muistinvirkistysmateriaaliksi palvelemaan valmiita patologeja ja sairaalalubiologeja päivittäisessä työssä.

Verifiointiarkiston lisäksi tässä tutkielmassa verifioitiin kolme uutta vasta-ainetta, SF-1, Pit-1 ja T-Pit, täsmentämään aivolisäkkeen adenoomien diagnostiikkaa. Vasta-aineita suositeltiin lisättäväksi aivolisäkkeen adenoomien diagnostiseen immunohistokemiallisten värjäysten paneeliin WHO:n aivolisäkkeen kasvainten luokitteluoppaan 5. painoksessa (Asa ym. 2022). Näitä vasta-aineita käytettiin tässä tutkielmassa esimerkkinä vasta-aineen verifiointiprosessista HUS Diagnostiikkakeskuksessa patologian laboratoriossa, sekä demonstroimaan verifiointiarkiston rakentumista.

Tutkimuskysymyksiä olivat:

1. Saadaanko luotua yhdenmukaistettu, helppokäyttöinen ja riittävän informaation sisältävä digitaalinen verifiointiarkisto, joka palvelee monipuolisesti HUS Diagnostiikkakeskuksen Patologian osaston henkilökuntaa?

2. Saadaanko transkriptiofaktorit Pit-1, SF-1 ja T-Pit optimoitua aivolisäkkeen adenoomien diagnostiikkaan?

Hypoteesit tutkimuskysymyksille olivat seuraavat:

1. Tutkimuksessa onnistutaan luomaan yhdenmukaistettu verifiointiarkisto HUS Diagnostiikkakeskuksen verifiointiraporteista ja raporttikohtaisista näytelaseista, koska vasta-aineista on saatavilla tarvittavat tiedot kirjaston rakentumiseksi, ja digitoimisen osalta on käytettävissä tarvittava teknologia.
2. Aivolisäkkeen transkriptiofaktorit SF-1, Pit-1 ja T-Pit verifioidaan onnistuneesti, ja vasta-aineilla tehtävät immunohistokemialliset värjäykset saadaan optimoitua HUS Diagnostiikkakeskus Patologian käyttöön. Tätä voidaan perustella laajalla näytöllä, jota vasta-aineilla on aivolisäkeadenoomadiagnostiikan osalta kirjallisuudessa.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Verifiointiarkisto

Digitaalisen verifiointiarkiston aineistona käytettiin HUS Diagnostiikkakeskus Patologian diagnostisten immunohistokemiallisten vasta-aineiden verifiointiraportteja ja raporttikohaisia potilasnäytelaseja. Arkiston rakentuminen sisälsi kaksi vaihetta: raporttien digitoimisen ja näytelasien skannaamisen. Digitoitavia verifiointiraportteja oli yli 300, joten prosessi jaettiin osiin.

Yhteen raporttiin sisältyi yksi tai useampi verifiointilasi, jotka skannattiin 3DHi-tech:n mikroskooppiskannerilla (Pannoramic SCAN 150, 40x/NA 0.95). Skannaamista varten lasit puhdistettiin mikrokuituliinalla, ja mahdolliset merkinnät poistettiin 100 % etanolin avulla. Verifiointilasit skannattiin pääosin mikroskooppiskannerin automaattiasetuksia käyttäen; skanneri valitsi automaattisesti esimerkiksi tarkennuspisteiden määrän ja sijainnin, fokusointialueen, sekä threshold-arvon, jonka perusteella skanneri erotteli näytteen taustasta. Mikäli

automaattiskannauksessa ilmeni ongelmia, yksittäisiä mikroskooppilaseja skannattiin manuaaliasetuksilla. Tällöin näytelasikohtaiset treshold-arvo, sekä ylä- ja alarajat fokusoinnille voitiin määrittää manuaalisesti niin, että skannauksesta saatiin mahdollisimman laadukas. Automaatti- ja manuaaliskannauksista syntyvät kuvat tallennettiin HUS:n verkkoasemalle. Skannauksen laatu varmistettiin vielä käymällä kuvat yksitellen läpi SlideViewer-ohjelman (versio 2.6) avulla.

Joidenkin vanhempien näytelasien peitinkalvot lähtivät irtoamaan lasin reunoilta etanolipuhdistuksen yhteydessä. Näissä tapauksissa vanha kalvo irrotettiin liottamalla lasia ensin asetonissa noin viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen kalvo poistettiin näytteen päältä pinsettien avulla. Lasi käytettiin vielä nopeasti ksyleenissä, minkä jälkeen se peiteltiin uudelleen automatisoidulla peittelykoneella (Tissue-Tek® Film™, Sakura). Tämän jälkeen näytelasit skannattiin normaalisti.

Näytelasien digitoinnin lisäksi myös verifiointiraporttien tekstiosuus tuli saattaa digitaaliseen muotoon. Raporttien formaatti ja sisältö vaihtelivat tekijän ja raportin iän mukaan: uudemmat raportit noudattivat samaa pohjaa, kun taas vanhemmissa oli enemmän variaatiota. Lisäksi kaikista vanhemmista raporteista digitaalista versiota ei ollut olemassa, jolloin dokumentit tuli siirtää digitaaliseen muotoon manuaalisesti. Raporttien digitalisaatioon kuului tietojen päivittämistä kirjallisuuteen perustuen, tietojen siirtämistä uuteen verifiointiraporttipohjaan, tekstiosuuden tiivistämistä ja kääntämistä englannista suomen kielelle sekä vasta-aineen ominaisuuksista kertovien kirjallisuusviitteiden etsimistä. Digitoituihin raportteihin lisättiin myös havainnollistavia kuvia vasta-ainevärjäyksistä. Tämä tehtiin liittämällä raportteihin kuvia skannatuista potilasnäytelaseista 3DHistech:n Slideviewer -ohjelman (versio 2.6) avulla. Yhdestä näytteestä otettiin kuvat kahdella eri suurennoksella. Suurennoksella 2x tai 5x otetussa kuvassa pystyttiin tarkastelemaan näytettä kokonaisuudessaan, ja suurennoksella 20x tai 40x avulla nähtiin tarkemmin vasta-aineella värjäytyvät rakenteet. Suurennoksen valinta riippui näytteestä ja paikannettavasta rakenteesta.

2.2 Vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointi

2.2.1 Aineisto

Vasta-ainekloonit ja -valmistajat (Taulukko 1) valittiin kirjallisuuden perusteella. Kunkin transkriptiofaktorin osalta etsittiin tutkimuksia, joissa kyseisellä vasta-aineella oli värjätty aivolisäkenäytteitä. Jokaisesta vasta-aineesta pyrittiin valitsemaan mahdollisimman spesifin ja sensitiivisen värjäystuloksen tuottava kloonit ja luotettava valmistaja. Casar-Borota ym. (2021) ja Neou ym. (2020) tutkimusten perusteella SF-1 vasta-aineeksi valittiin Abcamin valmistama EPR19744-kloonit. McDonald ym. (2017) ja Turchini ym. (2021) tutkimusten pohjalta Pit-1 vasta-aineen valmistajaksi valittiin Santa-Cruz Biotechnology Inc, kloonit D-7. T-Pit vasta-aineeksi puolestaan valittiin Casar-Borota ym. (2021), Neou ym. (2020) ja Turchini ym. (2021) tutkimusten perusteella kloonit CL6251 valmistajalta Atlas Antibodies.

Taulukko 1. Vasta-aineisiin ja immunohistokemialliseen värjäykseen liittyvät tiedot.

Vasta-aine	Kloonit (tuotenro, valmistaja)	Tuotanto-eläin	Laimennos-suhde	Detektio-menetelmä	Värjäyslaite
TPIT	CL6251 (AMAb91409, Atlas Antibodies)	Hiiri	1:1000	Optiview DAB (Ventana)	Ventana Benchmark Ultra
Pit-1	D-7 (sc393943, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	Hiiri	1:200	Optiview DAB (Ventana)	Ventana Benchmark Ultra
SF-1	EPR19744 (ab217317, Abcam)	Kani	1:500	Optiview DAB (Ventana)	Ventana Benchmark Ultra

Aivolisäkkeen adenoomanäytteet vasta-aineiden verifiointia varten saatiin HUS Diagnostiikkakeskuksen potilasnäytearkistosta. Potilasnäytteitä haettiin QPati-potilastietojärjestelmän avulla rajaamalla hakutulokset ensisijaisesti diagnoosin (adenooma) ja kohde-elimen (aivolisäke) mukaan. Tutkimukseen valittiin kaksi

eri potilasnäytettä kaikista yhtä aivolisäkehormonia ilmentävistä adenooma-luokista (ACTH, FSH, GH, LH, PRL ja TSH). Näytteen tuli ilmentää vain yhtä aivolisäkehormonia, tuottaa selkeä positiivinen värjäystulos immunohistokemiallisella hormonivärjäyksellä ja olla riittävän runsas. Lisäksi kudospaneeliin valittiin kaksi toimimatonta (hormonaalisesti mykkää) adenoomaa, jotka eivät olleet värjäytyneet millään aivolisäkehormoneilla.

2.2.2 Menetelmät

Verifiointi aloitettiin värjäämällä normaalia aivolisäkettä. Parafiiniin valetuista näytteistä eli niin sanotuista näyteblokeista leikattiin 3 µm paksuisia leikkeitä vesiliukumikrotomilla (Microm HM355S, Thermo Scientific). Leikkeet siirrettiin mikroskooppilaseille, ja kiinnitettiin laseihin pitämällä niitä tunnin ajan lämpökaapissa 60 °C:n lämpötilassa.

Kustakin vasta-aineesta valmistettiin valmistajien suositusten perusteella useampia laimennoksia. T-Pit-vasta-aineesta valmistettiin laimennossarja 1:1000, 1:2000 ja 1:3000, Pit-1 vasta-aineesta laimennokset 1:100, 1:200 ja 1:500, ja SF-1-vasta-aineesta laimennokset 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 ja 1:3000. Laimennusliuoksena käytettiin Dako REAL™ Antibody diluent-liuosta (Dako).

Immunohistokemiallinen värjäys tehtiin Ventanan automatisoidulla värjäyskoneella (Benchmark ULTRA). Vasta-aineen detektoimiseen oli mahdollista käyttää Ventanan Ultraview DAB, Ultraview RED tai Optiview DAB detektiokittiä. Näistä vaihtoehtoista valittiin kokeiltavaksi Optiview DAB-kitti, jolla odotettiin aiemman kokemuksen perusteella saatavan paras värjäystulos. Immunohistokemiallisen värjäyksen jälkeen näytteille tehtiin vielä tumavärjäys Sakuran Tissue-Tek® Prisma™ -värjäyskoneella. Lopuksi näytelasit peiteltiin muovikalvolla automatisoidulla peittelykoneella (Tissue-Tek® Film™, Sakura).

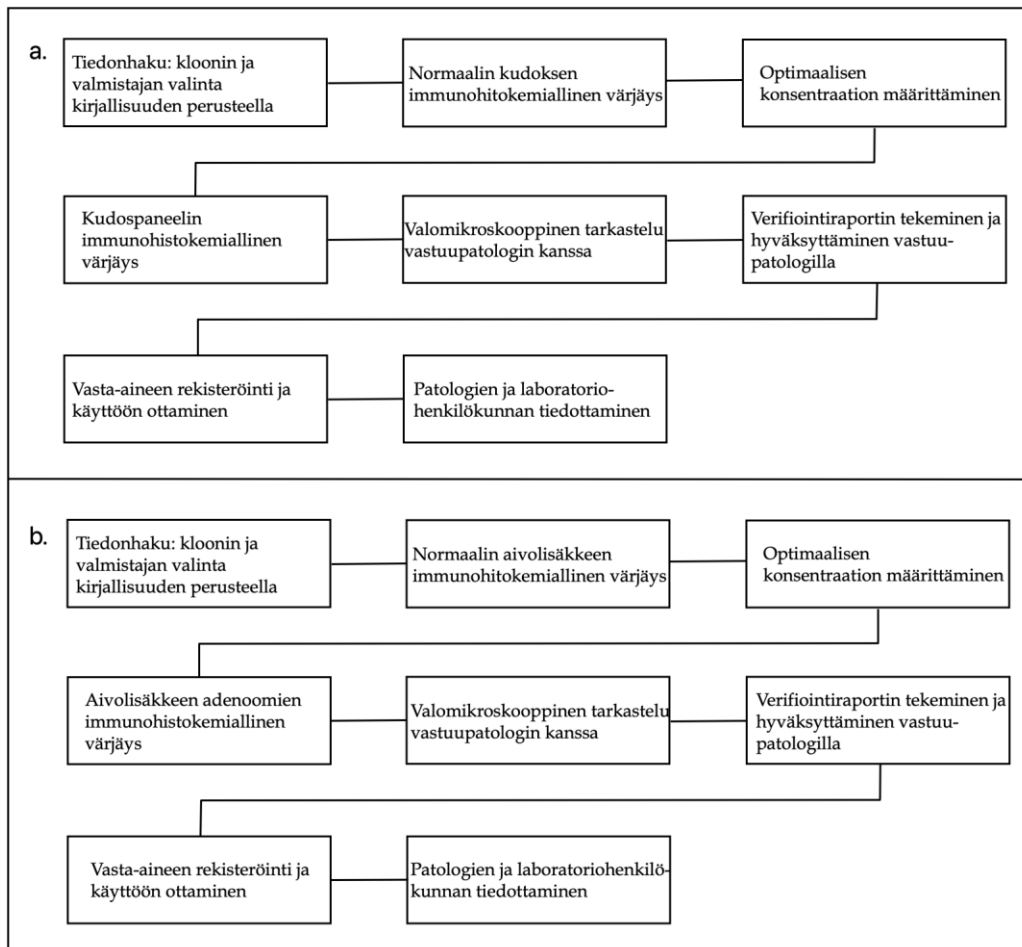
Valomikroskooppisen tarkastelun perusteella laimennoksista valittiin konsentraatiot, jotka tuottivat optimaalisen värjäystuloksen normaalissa aivolisäkkeessä. Värjäysprotokollaa ei ollut tarpeen muokata, joten verifiointia jatkettiin adenoomanäytteiden immunohistokemiallisilla värjäyksillä. Parafiiniin

valetuista adenoomanäytteistä leikattiin vesiliukumikrotomilla 3 µm paksuisia leikkeitä, jotka siirrettiin mikroskooppilaseille. Näytteet kiinnitettiin lasihin pitämällä niitä tunti lämpökaapissa 60 °C:n lämpötilassa. Kaikki potilasnäytteet värjättiin vasta-aineilla Pit-1, SF-1 ja T-Pit Ventanan Benchmark Ultra -värjäyslaitteella. Pit-1 -värjykset tehtiin laimennoksella 1:200, SF-1 -vasta-ainevärjykset laimennoksella 1:500 ja T-Pit -värjykset laimennoksella 1:1000. Detektiomenetelmänä käytettiin Ventanan Optiview DAB -detektiokittiä. Lopuksi näytteille tehtiin vielä tumavärjäys ja peittely.

2.2.3 Vasta-aineen käyttöönotto ja verifiointiraportin laatiminen

Vasta-aine voidaan ottaa diagnostiseen käyttöön vastuupatologin antaessa hyväksynnän vasta-aineen käyttööntamiseksi onnistuneen verifiointiprosessin seurauksena (Kuva 9). Vasta-aineilla Pit-1, SF-1 ja T-Pit värjättyjä adenoomanäytelaseja mikroskoipoitiin yhdessä neuropatologian erikoislääkärin kanssa, joka ottaa diagnostisen vastuun, ja arvioi värjäyksiä diagnostisesta näkökulmasta. Mikroskooppisessa tarkastelussa arvioitiin vasta-aineiden spesifisyyttä ja värjäyksen intensiteettiä. Tulosten perusteella neuropatologi antoi hyväksyntänsä vasta-aineille Pit-1, SF-1 ja T-Pit otettavaksi käyttöön aivolisäkkeen adenoomien diagnostiikassa.

Vasta-aineet rekisteröitiin My+ -potilastietojärjestelmään ja lisättiin laboratorion arkistointiohjelmiin (esimerkiksi varastokirjanpitoon ja vasta-aineiden laimennoslistalle) ja värjäyskoneiden listoille. Lopulta vasta-aineiden käyttöön ottamisesta tiedotettiin suullisesti immunohistokemian laboratorion henkilökuntaa ja sähköpostitse patologian erikoislääkäreitä sekä erikoistuvia patologeja. Patologeille ja erikoistuville patologeille lähetettiin myös vasta-aineiden verifiointiraportit ja Powerpoint-tiedosto, jossa oli kuvia ja tietoa vasta-ainevärjäyksistä.



Kuva 9. a) Vasta-aineen käyttöön ottamisen yleinen protokolla patologian laboratoriossa, b) esimerkkinä aivolisäkkeen transkriptiofaktorien Pit-1, SF-1 ja T-Pit käyttöönotto.

Vasta-aineen verifiointi tulee dokumentoida verifiointiraportin muodossa, joten vasta-aineille Pit-1, SF-1 ja T-Pit tehtiin verifiointiraportit. Raporttiin kirjattiin ensimmäiseksi vasta-aineen tiedot ja käyttöä koskevat yksityiskohdat: nimi, tuotenumero, kloni, valmistaja, vasta-aineen laimennos, värjäyskoneen ohjelma ja detektiomenetelmä. Verifiointiraporttiin kirjattiin myös lyhyt tiivistelmä vasta-aineen toiminnasta ja käyttöindikaatiosta, jotta dokumenttia lukeva henkilö saisi nopean johdatuksen vasta-aineen toimintaan. Tiedot tähän osioon etsittiin kirjallisuudesta. Käytetyt lähteet kirjattiin lähdeluetteloksi dokumentin loppuun. Verifiointissa käytettyjen aivolisäkkeen adenoomien potilasnumerot kirjattiin osioon, johon listataan verifiointiin käytetty materiaali. Potilasnumeroiden yhteyteen kirjattiin myös diagnoosi ja elin, josta näyte oli peräisin. Lisäksi raporttiin

lisättiin havainnollistavia kuvia vasta-aineella tehdyistä immunohistokemiallisista värjäyksistä, sekä värjäystä selittävä kuvateksti. Näin vasta-aineeseen tutustuva henkilö saisi nopeasti käsityksen siitä, miltä onnistuneen värjäyksen tulee näyttää. Lopuksi dokumenttiin kirjattiin vielä ohjeistus värjäyksen tulkintaan ja immunohistokemiallisissa värjäyksissä käytettävä kontrollikudosmateriaali.

3 TULOKSET

3.1 Verifiointiarkisto

Tuloksena verifiointiarkisto-projektista saatiin yhdenmukaistettu digitaalinen arkisto HUS Diagnostiikkakeskus Patologian diagnostisten vasta-aineiden verifiointiraportteja ja skannattuja raporttikohtaisia verifiointilaseja. Projektin tarkoitus oli yhdenmukaistaa ja digitoida kaikki HUS Diagnostiikkakeskus Patologian immunohistokemiallisten vasta-aineiden verifiointiraportit. Projekti kuitenkin venyi useampien syiden seurauksena, joten kaikkia verifiointiraportteja ei tässä ajassa saatu yhdenmukaistettua ja digitoitua. Digikirjasto on Diagnostiikkakeskuksen omaisuutta, eikä se ole julkisesti jaettavaa tietoa. Näin ollen arkistoa ei liitetä tähän pro gradu -tutkielmaan. Esimerkkinä verifiointiarkistosta toimivat vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointiraportit.

3.2 Vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointi

Tuloksena vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointiprosessista saatiin kyseisillä vasta-aineilla värjättyjä aivolisäkkeen adenoomanäytteitä, sekä normaalia aivolisäkettä sisältäviä kontrollinäytteitä (Kuva 10). Normaalissa aivolisäkkeessä SF-1 värjää positiivisesti gonadotroopit, kun taas Pit-1 värjää tyreotroopit, laktootroopit ja somatotroopit, ja T-Pit puolestaan kortikotroopit. Adenoomanäytteissä positiivisena värjäytyy pääosin adenoomasolukko.

	SF-1	PIT-1	T-PIT
Normaali aivolisäke	(+)	(+)	(+)
TSH+ adenooma 1	(-)	(+)	(-)
TSH+ adenooma 2	(-)	(+)	(-)
GH+ adenooma 1	(+)	(+)	(-)
GH+ adenooma 2	(+)	(+)	(-)
PRL+ adenooma 1	(-)	(+)	(-)
PRL+ adenooma 2	(-)	(+)	(-)
ACTH+ adenooma 1	(-)	(-)	(+)
Δ ACTH+ adenooma 2	(-)	(-)	(+)
FSH+ adenooma 1	(+)	(-)	(-)
FSH+ adenooma 2	(+)	(-)	(-)
LH+ adenooma 1	(+)	(-)	(-)
LH+ adenooma 2	(+)	(-)	(-)
Mykkä adenooma 1	(+)	(-)	(-)
Mykkä adenooma 2	(+)	(-)	(-)

Kuva 10. Vasta-aineilla SF-1, Pit-1 ja T-Pit värjätyt normaalit aivolisäkkeet ja aivolisäkkeen adenoomanäytteet (40x -suurennos). Positiivinen värjäytyminen näkyy ruskeana värjäytymisenä solujen tumissa. Vasta-aineen positiivisuus näytteessä on merkattu kuvan yläreunaan merkinnällä + ja negatiivisuus merkinnällä -.

Tuloksena vasta-aineiden verifointiprosessista saatiin myös vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifointiraportit (Liite 1, Liite 2 ja Liite 3). Verifointiraporteista on poistettu potilasnumerot tietoturvasyistä.

4 TULOSTEN TARKASTELO

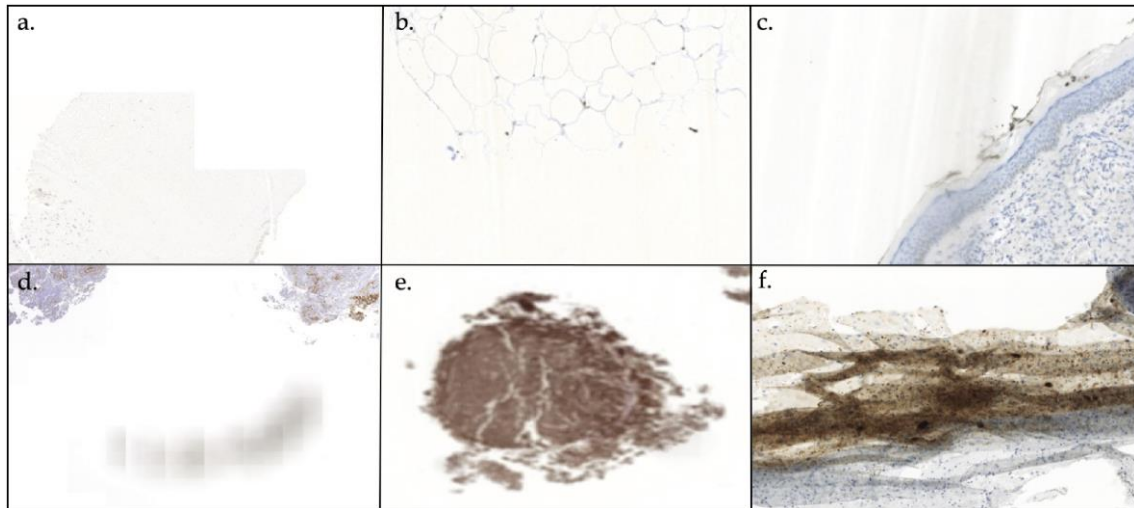
4.1 Verifointiarkisto

Valtaosa verifointilasien skannauksista tuotti selkeitä ja hyvälaatuisia kuvia. Yksi merkittävimmistä skannaamiseen liittyvistä ongelmista oli rikkoutuneet verifointilasit, sillä mikroskooppiskanneriin ei ollut mahdollista asettaa vahingoittuneita laseja. Skannaustuloksiin vaikutti myös muita virhelähteitä (Kuva 11).

Osa ongelmista liittyi näytteen tai näytelasin väriin: vaalean värisissä näytteissä skanneri ei välttämättä erottanut näytettä taustasta, ja osa näytteestä saattoi skannauksessa leikkautua pois kuvasta. Esimerkiksi Kuvassa 11a skannerin tarkennuspiste ei ole tunnistanut näytettä, joten vain osa näytteestä on skannattu. Tällaiset ongelmat voitiin ratkaista skannaamalla näyte manuaalisesti käyttäen matalampaa treshold-arvoa. Treshold-arvon laskemisen haittapuolena kuvaan tosin saattoi skannautua helpommin taustaa. Kuvassa 11b mikroskooppilasi on kellastunut, mikä on vanhemmille näytelaseille yleinen ongelma. Kellastunut tausta voi vaikeuttaa vaaleanväristen näytteiden erottamista kuvasta. Kuvan 11b näytteessä ongelma korostuu, sillä tumat ovat kyseisessä kudoksessa melko harvassa.

Mikroskooppilaseissa olevat naarmut (Kuva 11c) sekä peitinkalvon alla ja päällä olevat roskat (Kuva 11d) vaikuttivat myös skannauksen laatuun. Nämä eivät kuitenkaan yleensä tehneet kuvasta tulkintakelvotonta. Peitonkalvon päällä olevista roskista ja pölystä suurin osa saatiin poistettua mikrokuituliinapuhdistuksen yhteydessä. Huonon resoluution aiheuttama sameus (Kuva 11e) oli merkittävin skannaustulosta heikentävä tekijä, sillä joidenkin näytteiden tulkitseminen oli mahdotonta huonon tarkennuksen takia. Tarkennusongelmia havaittiin esimerkiksi näytteiden kohdalla, joissa oli runsaasti ryppyjä (Kuva 11f).

Tarkennuspisteen alue saattoi skannautua suttuisesti esimerkiksi, jos tarkennuspiste oli rypyn kohdalla. Joidenkin näytteiden kohdalla skannerin automaattisesti valitsema tarkennusalue ei ollut riittävän laaja oikean tarkennuksen saavuttamiseksi. Näissä tapauksissa lasi skannattiin yksittäin manuaaliasetuksilla, ja tarkennusalue asetettiin sopivaksi. Muutamien näytelasien kohdalla tämäkään ei tuntemattomaksi jääneestä syystä tuottanut riittävän tarkkaa kuvaa.



Kuva 11. Laatua heikentäviä tekijöitä mikroskooppiskannauksessa: a) skanneri ei ole erottanut näytettä taustasta, b) näytteen tausta on kellertävä, c) peitinkalvon naarmut heikentävät kuvan laatua, d) näytelasissa on roska, e) skanneri ei ole tarkentanut näytteeseen kunnolla, ja f) näyte on rypyssä ja irtoillut lasilta.

Alun perin tavoitteena oli, että verifiointiarkistoon yhdenmukaistettaisiin ja digitoitaisiin kaikki HUS Diagnostiikkakeskus Patologian verifiointiraportit ja skannattaisiin raporttikohtaiset verifiointilasit. Projektia ei kuitenkaan aikataullisten haasteiden takia päästy toteuttamaan näin laajassa mittakaavassa. Arkiston rakentumista hidastivat esimerkiksi vanhempien verifiointiraporttien uudistamiseen käytetty aika ja edellä mainitut haasteet skannausprosessissa. Projektin tuloksena saatiin kuitenkin hyvä pohja verifiointiarkistolle, ja merkittävä osa verifiointiraporteista ja -laseista saatiin digitoitua.

4.2 Vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointi

Pit-1 -transkriptiofaktoria ilmennetään somatotrooppisissa, laktotrooppisissa ja tyreotrooppisissa solutyypeissä (Kelberman ja Dattani 2006). Pit-1 -värjäyksen

odotettiin siis olevan positiivinen GH-, PRL- ja TSH -hormoneita ilmentävissä aivolisäkkeen adenoomissa. Vasta-aine värjäsi odotetusti kaikki tutkimuksessa olleet Pit-1 -solulinjan kasvainten adenoomasolujen tumat vahvalla tummanruskealla värillä. Väri oli selkeästi tumissa, eikä tarttunut kalvorakenteisiin tai lähtenyt diffuntoitumaan solulimaan. Pit-1 -vasta-aine värjäsi myös normaalista aivolisäkkeestä somatotrooppi-, laktotrooppi- ja tyreotrooppisolujen tumat. Värjäys ei ollut intensiteetiltään yhtä vahva kuin adenoomanäytteissä, mutta riittävän vahva positiivisen tuloksen tulkitsemista varten. Pit-1 ei värjänyt tässä tutkimuksessa olleita toimimattomia adenoomia.

T-Pit -transkriptiofaktoria ilmennetään ACTH -hormonia tuottavissa kortikotrooppisoluisissa, joten vasta-aineen odotettiin värjäävän ACTH -hormonia ilmentävät aivolisäkkeen adenoomat (Kelberman ja Dattani 2006). Immunohistokemiallisessa värjäyksessä T-Pit värjäsi vahvalla intensiteetillä kummankin tutkimuksessa olleen ACTH -hormonia ilmentävän adenoomakasvaimen tumat. Väri pysyi spesifisti tumissa, eikä värjänyt kalvorakenteita tai diffuntoitunut solulimaan. T-Pit -vasta-aine värjäsi myös normaalissa aivolisäkkeessä kortikotrooppisolujen tumat voimakkaasti. T-Pit ei värjänyt tässä tutkimuksessa olleita toimimattomia adenoomia.

SF-1 on transkriptiofaktori, jota ilmennetään gonadotroopeissa (Burcea ym. 2021). Näin ollen vasta-aineen tulisi värjätä LH- ja FSH -hormoneja ekspressoivat adenoomat. Kirjallisuuden perusteella voitiin odottaa myös, että tässä tutkimuksessa verifioiduista vasta-aineista SF-1 todennäköisimmin värjäisi toimimattomia adenoomia (Mete ym. 2018, Drummond ym. 2019, Silva-Ortega ym. 2020). Immunohistokemiallisessa värjäyksessä vasta-aine värjäsi LH- ja FSH -hormoneja ilmentävät adenoomat sekä molemmat toimimattomat adenoomat. Kaikissa tapauksissa positiivisuus ilmeni keski- tai tummanruskeana värjäytymisenä solujen tumissa, jättäen soluliman ja kalvorakenteet pääosin negatiiviseksi. Molemmissa FSH -positiivisissa adenoomissa ja toisessa LH -hormonia ilmentävässä adenoomassa oli havaittavissa heikkoa taustavärjäytymistä solulimassa. Normaalissa aivolisäkkeessä gonadotrooppisolujen tumat eivät värjäytyneet yhtä

voimakkaasti kuin adenoomasolukon tumat, mutta riittävän vahvasti positiivisen tuloksen tulkitsemista varten.

Yllättävää tuloksissa oli se, että SF-1 värjäsi voimakkaasti myös Pit-1 -solulinjaan kuuluvat GH -hormonia ilmentävät adenoomat. SF-1 -vasta-aineen positiivisen värjäytymisen intensiteetti oli verrattavissa Pit-1 -vasta-aineella tehtyihin immunohistokemiallisiin värjäyksiin. Kumpikaan GH -hormonia ilmentävistä adenoomista ei ollut osoittanut positiivisuutta aiemmin tehdyissä LH ja FSH -hormonivärjäyksissä. Aivolisäkkeen adenoomat ovat peräisin adenohipofyyysin soluista, joten tavallisesti kasvain ilmentää vain yhtä transkriptiofaktoria ja saman solulinjan hormonia (Lake ym. 2013). SF-1 ja Pit-1 -transkriptiofaktorit ovat erillisiä solulinjoja, joten koekspressio adenoomasvaimessa on epätodennäköistä (Tordjman ym. 2019). Lisäksi tässä tapauksessa GH -hormonia ilmentävät kasvaimet eivät olleet osoittaneet positiivisuutta LH- ja FSH -hormonivärjäyksissä, vaan ilmensivät ainoastaan gonadotrooppilinjan transkriptiofaktoria. Värjäys toistettiin kolme kertaa, jotta virheet voitiin sulkea pois. Tuloksen varmentamiseksi GH -adenoomat lähetettiin Kuopion Yliopistolliseen sairaalaan värjättäväksi SF-1 -vasta-aineella. Tulokset olivat yhteneviä, vaikka värjäyksessä käytettiin eri vasta-ainekloonina. Tuloksista konsultoitin vielä Karoliinista Instituuttia. Konsultaatiosta kävi ilmi, että Karoliinisessa Instituutissa oli myös huomattu eri solulinjojen transkriptiofaktorien koekspressiota aivolisäkkeen adenoomissa. Värjäyksen toistamisen, konsultaation ja eri kloonilla tehdyn varmentamisen perusteella värjäystulokset todettiin paikkansa pitäviksi.

Eri solulinjojen transkriptiofaktoreiden koekspressiosta aivolisäkkeen adenoomatapauksissa on olemassa vähäisesti kirjallisuutta, mutta SF-1 ja Pit-1 -vasta-aineiden koekspressiosta GH-adenoomissa on kuitenkin havaittu tutkimuksissa. Silva-Ortega ym. (2021) tutkimuksessa SF-1 -vasta-aineen havaittiin värjäytyvän positiivisesti kolmessa GH -hormonia ilmentävässä adenoomasvaimessa. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä käytettiin samaa vasta-ainekloonina samalta valmistajalta kuin tässä tutkielmassa. Tamanini ym. (2020) tutkimuksessa SF-1- ja Pit-1 -transkriptiofaktorit koekspressoituivat seitsemässä GH-

adenoomassa. Lisäksi transkriptiotekijöiden koekspressiota muissa adenooma-tyypeissä on raportoitu (Tamanini ym. 2020, Hong ym. 2021).

Tutkimuksen vastuupatologina toimiva neuropatologian erikoislääkäri Olli Tyninen kommentoi eri solulinjojen välistä värjäytymistä seuraavanlaisesti: "Pit-1 ja SF-1 kaksoispositiiviset plurihormonaaliset adenoomat ovat mahdollisia, mutta harvinaisia. Jos kaksoispositiivisuutta alkaa esiintyä värjäyksissä usein, olisi syytä tarkistaa värjäykset mahdollisen teknisen virheen varalta". Tämän tutkimuksen tulokset ja edellä mainittu kirjallisuus herättävät kuitenkin kysymyksen siitä, että onko vasta-aineiden toiminta niin suoraviivaista, kuin kirjallisuudessa annetaan ymmärtää. Hong ym. (2021) tutkimuksessa huomautetaan myös, että WHO:n suosituksessa ei ole ohjeita useampaa transkriptiofaktoria ilmentävien adenoomien luokittelemiseksi. Useampia transkriptiofaktoreita ilmentäviä adenoomia olisi myös syytä tutkia aiempaa perusteellisemmin.

Aivolisäkkeen transkriptiofaktorivärjäysten toiminnasta adenoomien luokittelussa oli näyttöä lukuisissa tutkimuksissa (Neou ym. 2020, Silva-Ortega ym. 2021, Hong ym. 2021), joten vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointin onnistumiselle oli vahvat perusteet. Odottamattomista tuloksista huolimatta kaikki vasta-aineet otettiin käyttöön verifiointiprosessin päätteeksi käyttöön aivolisäkeadenoomien diagnostiikkaan HUS Diagnostiikakeskuksen Patologian laboratoriossa. Diagnostisessa ketjussa odottamattomien värjäystulosten kohdalla patologi informoi klinikkoa asiasta moniammatillisessa hoitotiimikokouksessa. Vasta-aineiden verifiointiprosessi saatiin loppuun onnistuneesti.

5 PÄÄTELMÄT

Tämän tutkielman tarkoituksena oli luoda digitoitu arkisto HUS Diagnostiikakeskus Patologian verifiointiraporteille ja raporttikohtaisille potilasnäytelaseille. Verifiointiarkisto suunnattiin apuvälineeksi erikoistuville patologeille ja sairaalaselubiologeille, sekä muistinvirkistykseksi patologeille ja sairaalaselubiologeille päivittäiseen työhön. Arkistoon ei ehditty saamaan kaikkia

immunohistokemian laboratoriossa käytettäviä vasta-aineita, mutta merkittävä osa verifiointiraporteista yhdenmukaistettiin ja digitoitiin. Tämä loi hyvän pohjan arkiston rakentumiselle tulevaisuudessa.

Tutkielman toisena tarkoituksena oli verifioida vasta-aineet Pit-1, SF-1 ja T-Pit, ja ottaa ne käyttöön aivolisäkkeen adenoomien erotusdiagnostiikassa. Vasta-aineet verifioitiin onnistuneesti, ja ne otettiin käyttöön patologian laboratoriossa HUS Diagnostiikkakeskuksessa. Projektin vastuupatologi Olli Tynninen kuvaili vasta-aineiden hyödyllisyyttä diagnostiikkaan ja aivolisäkkeen adenoomakasvainten luokitteluun välttämättömäksi, sillä täsmällinen luokittelu on olennaista riskiarvioinnin ja potilaan seurannan kannalta. SF-1 -vasta-aineen käyttöindikaatio tulee todennäköisesti laajenemaan tulevaisuudessa aivolisäkkeen adenoomien ohella myös muuhun diagnostiikkaan. Vasta-aineiden Pit-1, SF-1 ja T-Pit verifiointiraportit toimivat myös esimerkkiraportteina verifiointiarkistosta.

KIITOKSET

Valtaiset kiitokset ohjaajilleni sairaalalubiologi Mia Kerolle ja patologi Teijo Kuopiolle tuesta ja avusta tämän pro gradu -tutkielman kanssa. Erityiset kiitokset myös neuropatologi Olli Tynniselle, erikoistuville sairaalalubiologeille Anna Rauniolle, Reija Randen-Bradylle ja Noora Anderssonille, sekä muulle HUS Diagnostiikkakeskus Patologian henkilökunnalle avusta projektini kanssa. Kiitokset myös HUS Diagnostiikkakeskus Patologialle tutkielman rahoittamisesta.

Jyväskylässä 14.5.2023
Emmi Rimpioja

KIRJALLISUUSLUETTELO

- Abels E., Pantanowitz L., Aeffner F., Zarella M.D., van der Laak J., Bui M.M., Vemuri V., Parwani A.V., Gibbs J., Agosto-Arroyo E., Beck A.H. & Kozlowski C. 2019. Computational pathology definitions, best practices, and recommendations for regulatory guidance: a white paper from the Digital Pathology Association. *J Pathol*. 249: 286–294.
- Al-Brahim N.Y.Y. & Asa S.L. 2006. My approach to pathology of the pituitary gland. *J Clin Pathol*. 59: 1245–1253.
- Allehaibi E., AlMalki M.H. & Brema I. 2021. Plurihormonal pituitary macroadenoma: a case report. *J Med Case Reports*. 15, 407, doi:10.1186/s13256-021-02948-6.
- Asa S.L., Mete O., Perry A. & Osamura R. 2022. Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*. 33: 6–26.
- Bahrami A., Truong L.D. & Ro J.Y. 2008. Undifferentiated tumor: True identity by immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 132: 326–48.
- Burcea I.F., Năstase V-N. & Poiană C. 2021. Pituitary transcription factors in the immunohistochemical and molecular diagnosis of pituitary tumours – a systematic review. *Endokrynol Pol*. 72: 53–63.
- Casar-Borota O., Boldt H.B., Engström B.E., Andersen M.S., Baussart B., Bengtsson D., Berinder K., Ekman B., Feldt-Rasmussen U., Höybye C., Jørgensen J.O.L., Kolnes A.J., Korbonits M., Rasmussen Å.K., Lindsay J.R., Loughrey P.B., Maiter D., Manojlovic-Gacic E., Pahnke J., Poliani P.L., Popovic V., Ragnarsson O., Schalin-Jääntti C., Scheie D., Tóth M., Villa C., Wirenfeldt M., Kunicki J. & Burman P. 2021. Corticotroph Aggressive Pituitary Tumors and Carcinomas Frequently Harbor ATRX Mutations. *J Clin Endocr Metab*. 106: 1183–1194.
- Chapman P.R., Singhal A., Gaddamanugu S. & Prattipati V. 2020. Neuroimaging of the Pituitary Gland Practical Anatomy and Pathology. *Radiol Clin N Am*. 58: 1115–1133.
- De Matos L.L., Trufelli D.C., de Matos M.G.L. & da Silva Pinhal M.A. 2010. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomark Insights*. 5: 9–20.
- De Moraes D.C., Vaisman M., Conceição F.L. & Ortiga-Carvalho T.M. 2012. Pituitary development: a complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors. *J Endocrinol*. 215: 239–245.
- Drummond J., Roncaroli F., Grossman A.B. & Korbonits M. 2019. Clinical and Pathological Aspects of Silent Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 104: 2473–2489.
- Duraiyan J., Govindarajan R., Kaliyappan K. & Palanisamy M. 2012. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci*. 4: 307–309.
- Engel K.B. & Moore H.M. 2011. Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 135: 537–543.

- Farahani N., Parwani A.V. & Pantanowitz L. 2015. Whole slide imaging in pathology: advantages, limitations, and emerging perspectives. *Pathol Lab Med Int.* 7: 23–33.
- Fitzgibbons P.L., Bradley L.A., Fatheree L.A., Alsabeh R., Fulton R.S., Goldsmith J.D., Haas T.S. & Karabakhtsian R.G. 2014. Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays. *Arch Pathol Lab Med.* 138: 1432–1443.
- Go J.L. & Rajamohan A.G. 2017. Imaging of Sella and Parasellar Region. *Radiol Clin N Am.* 55: 83–101.
- Haapasalo H., Paetau A & Tynninen O. 2012a. Aivolisäkkeen anatomia ja ei-neoplastiset sairaudet. Teoksessa: Mäkinen M., Carpén O., Kosma V.-M., Lehto V.-P., Paavonen T. & Stenbäck F. (toim.), *Patologia*, Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Haapasalo H., Paetau A & Tynninen O. 2012b. Aivolisäkkeen adenooma. Teoksessa: Mäkinen M., Carpén O., Kosma V.-M., Lehto V.-P., Paavonen T. & Stenbäck F. (toim.), *Patologia*, Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Haddad A.F., Young J.S., Oh T., Pereira M.P., Joshi R.S., Pereira K.M., Osorio R.C., Donohue K.C., Peeran Z., Sudhir S., Jain S., Beniwal A., Chopra A.S., Sandhu N.S., Theodosopoulos P.V., Kunwar S., El-Sayed I.H., Gurrola II J., Blevins Jr L.S. & Aghi M.K. 2020. Clinical characteristics and outcomes of null-cell versus silent gonadotroph adenomas in a series of 1166 pituitary adenomas from a single institution. *Neurosurg Focus.* 48, E13, doi:10.3171/2020.3.FOCUS20114.
- Hsu S.-M., Raine L. & Fanger H. 1981. Use of Avidin-Biotin -Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison Between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *J Histochem Cytochem.* 29: 577–580.
- Hong S.W., Kim S.H., Lim S.H., Lee E.J., Kim S.H., Ku C.R. & Kim E.H. 2021. Clinical Relevance of New World Health Organization Classification System for Pituitary Adenomas: A Validation Study With 2-Year Experience. *Front Oncol.* 11: 1–8.
- Ibinaiye P.O., Olarinoye-Akorede S., Kajogbola O. & Bakari A.G. 2015. Magnetic Resonance Imaging Determination of Normal Pituitary Gland Dimensions in Zaria, Northwest Nigerian Population. *J Clin Imaging Sci.* 5, 29, doi:10.4103/2156-7514.157853.
- Ilahi S. & Ilahi T.B. 2022. *Anatomy, Adenohypophysis (Pars Anterior, Anterior Pituitary)*. StatPearls Publishing LLC, Treasure Island.
- Ivell R., Teerds K. & Hoffman G. E. 2014. Proper application of antibodies for immunohistochemical detection: antibody crimes and how to prevent them. *Endocrinol.* 155: 676–687.
- Jahn S.W., Plass M. & Moinfar F. 2020. Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives. *J Clin Med.* 9, 3697, doi:10.3390/jcm9113697.
- Lake M.G., Krook L.S. & Cruz S.V. 2013. Pituitary Adenomas: An Overview. *Am Fam Physician.* 88: 319–327.
- Lin F. & Chen Z. 2014. Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med.* 138: 1564–1577.

- Lindholm P., Matikainen N., Soinio M., Kivipelto L., Karppinen A. & Rahi M. 2017. Aivolisäkekasvainten hoito. *Duodecim*. 133: 1380–1389.
- Lopes M.B.S. 2017. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol*. 134: 521–535.
- Kelberman D. & Dattani M.T. 2006. The role of transcription factors implicated in anterior pituitary development in the aetiology of congenital hypopituitarism. *Ann Med*. 38: 560–577.
- Kumar N., Gupta R. & Gupta S. 2020. Whole Slide Imaging (WSI) in Pathology: Current Perspectives and Future Directions. *J Imaging*. 33: 1034–1040.
- Magaki S., Hojat S.A., Wel B., So A. & Yong W.H. 2019. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 1897: 289–298.
- McDonald W.C., Banerji N., McDonald K.N., Ho B., Macias V. & Kajdacsy-Balla A. 2017. Steroidogenic Factor 1, Pit-1, and Adrenocorticotrophic Hormone: A Rational Starting Place for the Immunohistochemical Characterization of Pituitary Adenoma. *Arch Pathol Lab Med*. 141: 104–112.
- Mete O., Cintosun A., Pressman I. & Asa S.L. 2018. Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors. *Mod Pathol*. 31: 900–909.
- Metso S., Haapasalo J., Sievers F., Haapasalo H & Jaatinen P. 2017. Aivolisäkekasvainten diagnostiikka. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*. 133: 1370–9.
- Nakata T. & Suzuki N. 2012. Chromogen-based Immunohistochemical Method for Elucidation of the Coexpression of Two Antigens Using Antibodies from the Same Species. *J Histochem Cytochem*. 60: 611–619.
- Neou M., Villa C., Armignacco R., Jouinot A., Raffin-Sanson M.-L., Septier A., Letourneur F., Diry S., Diedisheim M., Izac B., Gaspar C., Perlemoine K., Verjus V., Bernier M., Boulin A., Emile J.-F., Bertagna X., Jaffrezic F., Laloe D., Baussart B., Bertherat J., Gaillard S. & Assié G. 2020. Pangenomic Classification of Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Cancer Cell*. 37: 123–134.
- Niazi M.K.K., Parwani A.V. & Gurcan M.N. 2019. Digital pathology and artificial intelligence. *The Lancet. Oncol*. 20, e253–e261, doi:10.1016/S1470-2045(19)30154-8.
- Näpänkangas J. & Tolonen T. 2019. Adoption of diagnostic digital pathology in Finland. *Fin Je He W*. 11: 320–325.
- O’Hurley G., Sjöstedt E., Rahman A., Li B., Kampf C., Pontén F., Gallagher W.M. & Lindskog C. 2014. Garbage in, garbage out: A critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol*. 8: 783–798.
- Oien K.A. & Dennis J.L. 2012. Diagnostic work-up of carcinoma of unknown primary: from immunohistochemistry to molecular profiling. *Ann Oncol*. 23, x271–x277, doi:10.1093/annonc/mds357.
- Patel A., Balis U.G.J., Cheng J., Li Z., Lujan G., McClintock D.S., Pantanowitz L. & Parwani A. 2021. Contemporary Whole Slide Imaging Devices and Their Applications within the Modern Pathology Department: A Selected Hardware Review. *J Pathol Inform*. 12, 50, doi: 10.4103/jpi.jpi_66_21.

- Perez-Castro C., Renner U., Haedo M.R., Stalla G.H. & Arzt E. 2012. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev.* 92: 1–38.
- Picó A., Aranda-López I., Sesmilo G., Toldos-González Ó., Japón M.A., Luque R. & Puig-Domingo M. 2021. Recommendations on the pathological report of pituitary tumors. A consensus of experts of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition and the Spanish Society of Pathology. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición.* 68: 196–207.
- Sabattini E., Bisgaard K., Ascani S., Poggi S., Piccioli M., Ceccarelli C., Pieri F., Fraternali-Orcioni G. & Pileri S.A. 1998. The EnVision™+ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate™, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol.* 51: 506–511.
- Saeger W., Ludecke D.K., Buchfelder M., Fahlbusch R., Quabbe H-J. & Petersenn S. 2007. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol.* 156: 203–216.
- Sahni D., Jit I., Harjeet N. & Bhansali A. 2006. Weight and dimensions of the pituitary in northwestern Indians. *Pituitary.* 9: 19–26.
- Sane T. 2010a. Aivolisäkkeen etulohko. Teoksessa: Välimäki M., Sane T. & Dunkel L. (toim.), *Endokrinologia*, Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Sane T. 2010b. Aivolisäkkeen etulohkon sairaudet ja niiden hoito. Teoksessa: Välimäki M., Sane T. & Dunkel L. (toim.), *Endokrinologia*, Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Sen A., Das C., Mukhopadhyay S., Deb S. & Mukhopadhyay B. 2017. Cytohistological correlation in pituitary tumor and immunological assessment with the help of Ki-67. *J Postgrad Med.* 63: 96–99.
- SFS-EN ISO 15189:2012. Medical laboratories -- Requirements for quality and competence. Helsinki: SFS.
- Shojaeian S., Lay N.M. & Zarnani A.-H. 2020. Detection Systems on Immunohistochemistry. Teoksessa: Streckfus C.F. (toim.), *Immunohistochemistry - The Ageless Biotechnology*, IntechOpen, Lontoo.
- Silva-Ortega S., García-Martínez A., de Jaime M.N., Torregrosa M.E., Abarca J., Monjas I., Alfonso A.P. & López I.A. 2021. Proposal of a clinically relevant working classification of pituitary neuroendocrine tumors based on pituitary transcription factors. *Hum Pathol.* 110: 20–30.
- Tamanini J.V., Dal Fabbro M., de Freitas L.L., Vassallo J., de Souza Queiroz L. & Rogerio F. 2020. Digital analysis of hormonal immunostaining in pituitary adenomas classified according to WHO 2017 criteria and correlation with preoperative laboratory findings. *Neurosurg Focus.* 48, E12, doi: 10.3171/2020.3.FOCUS2039.
- Tani T. 2022. Patologian vastualueen toiminnan erityispiirteet. HUS Diagnostiikkakeskus, Patologia.
- Taylor C.R., Shi S.-R. Barr N.J. & Wu N. 2006. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. Teoksessa:

- Dabbs D.J. (toim.), *Diagnostic Immunohistochemistry*, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia.
- Tordjman K.M., Greenman Y., Ram Z., HersHKovitz D., Aizenstein O., Ariel O. & Asa S.L. 2019. Plurihormonal Pituitary Tumor of Pit-1 and SF-1 Lineages, with Synchronous Collision Corticotroph Tumor: a Possible Stem Cell Phenomenon. *Endocr Pathol.* 30: 74–80.
- Torlakovic E.E., Cheung C.C., D'Arrigo C., Dietel M., Francis G.D., Gilks B., Hall J.A., Hornick J.L., Ibrahim M., Marchetti A., Miller K., van Krieken J.H., Nielsen S., Swanson P.E., Vyberg M., Zhou X. & Taylor C.R. 2017. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine. Part 3: Technical Validation of Immunohistochemistry (IHC) Assays in Clinical IHC Laboratories. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 25: 151–159.
- Turchini J., Sioson L., Clarkson A., Sheen A. & Gill A.J. 2021. PD-L1 Is Preferentially Expressed in PIT-1 Positive Pituitary Neuroendocrine Tumours. *Endocr Pathol.* 32: 408–414.
- Turnquist C., Roberts-Gant S., Hemsworth H., White K., Browning L., Rees G., Roskell D. & Verrill C. 2019. On the Edge of a Digital Pathology Transformation: Views from a Cellular Pathology Laboratory Focus Group. *J Pathol Inform.* 10, 37, doi:10.4103/jpi.jpi_38_19.

LIITE 1. PIT-1 -VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI



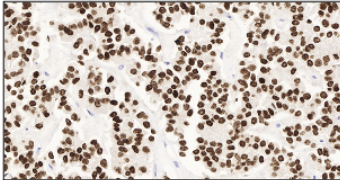
1 (3)

Ohje käytössä: Patologian vastuualueen yhteinen

VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI

Päivämäärä: 17.2.2023

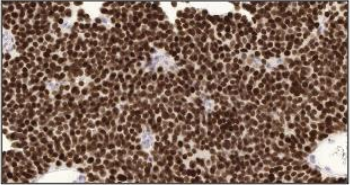
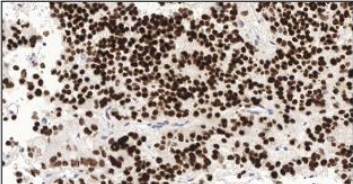
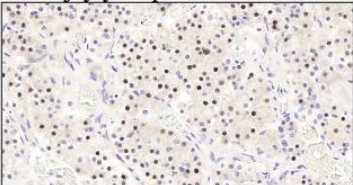
Verifiointin suorittajat/vastuuhenkilöt: Emmi Rimpioja ja sairaalaselubiologi Mia Kero sekä neuropatologian erikoislääkäri Olli Tynnenen

Vasta-aine	Pit-1 Klooni: D-7 Tuotenro: sc-393943 Valmistaja: Santa Cruz Biotechnology Inc Ohjelma: 123 Laimennos: 1:200
Käyttötarkoitus	Pit-1 (Pituitary-Specific Positive Transcription Factor 1) on transkriptiofaktori, jota ekspressoidaan aivolisäkkeen etulohkossa kolmessa eri solutyypissä: prolaktiinia tuottavissa laktotroopeissa, tyreotropiinia tuottavissa tyreotroopeissa ja kasvuhormonia tuottavissa somatotroopeissa. Se on välttämätön transkriptiofaktori kyseisten solutyypien kehityksen osalta. Pit-1 vasta-ainetta voidaan käyttää tunnistamaan prolaktiinia, kasvuhormonia ja kilpirauhashormonia tuottavat Pit-NET-tuumorit, ja erottamaan nollasoluadenoomat hormonaalisesti mykistä kasvaimista.
Menetelmä	Optiview-kitti (Roche/Ventana)
Verifiointiin käytetty materiaali	HGH-hormonia ekspressoiva adenooma, (hypophysis). Adenoomasolut värjäytyvät positiivisesti Pit-1 vasta-aineella.  HGH-hormonia ekspressoiva adenooma, (hypophysis)

Vasta-aineen verifiointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

Z:\AA-uusi-lablaatu\2-PATOLOGIA\Vastuualueen yhteiset ohjeet\Yhteiset ohjeet\Vasta-aineen verifiointiraportti_Patologia_20210430.docx

Ohje käytössä: Patologian vastuualueen yhteinen

	<p>PRL-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis). Adenoomasolut värjäytyvät positiivisesti Pit-1 vasta-aineella.</p>  <p>PRL-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis)</p> <p>TSH-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis). Adenoomasolut värjäytyvät positiivisesti Pit-1 vasta-aineella.</p>  <p>TSH-hormonia ekspressoiva adenooma, (hypophysis)</p> <p>Normaali aivolisäke, HGH-, TSH- ja PRL-hormoneja ekspressoivat solut värjäytyvät positiivisesti Pit-1 vasta-aineella.</p> 
<p>Tulos ja sen tulkinta</p>	<p>Prolaktiinia, kasvuhormonia ja tyreotropiinia tuottavat solut värjäytyvät nuklearisesti.</p>

Vasta-aineen verifointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

Z:\AA-uusi-lablaatu\2-PATOLOGIA\Vastuualueen yhteiset ohjeet\Yhteiset ohjeet\Vasta-aineen verifointiraportti_Patologia_20210430.docx

Ohje käytössä: Patologian vastuualueen yhteinen

Menetelmän säännönmukaiset kontrollit	Aivolisäke
Kirjallisuusviitteet	<p>Asa S L., Mete O., Perry A. & Osamura R.Y. 2022. Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumor. <i>Endocr Pathol</i> 33, 6–26. https://doi.org/10.1007/s12022-022-09703-7</p> <p>Lee, J.C., Pekmezci, M., Lavezo, J.L. <i>et al.</i> Utility of Pit-1 Immunostaining in Distinguishing Pituitary Adenomas of Primitive Differentiation from Null Cell Adenomas. <i>Endocr Pathol</i> 28, 287–292 (2017). https://doi.org/10.1007/s12022-017-9503-6</p> <p>Sobrier M-L., Tsai Y-C., Pérez1 C., Leheup B., Bouceba T., Duquesnoy P., Copin B., Sizova D., Penzo A., Stanger B.Z., Cooke N.E., S.A. & Amselem S. 2016. Functional characterization of a human POU1F1 mutation associated with isolated growth hormone deficiency: a novel etiology for IGHD. <i>Human Molecular Genetics</i>, 25:3 472–483</p>

17.2.2023 / Olli Tynnin
Päiväys ja hyväksyjän allekirjoitus

Vasta-aineen verifointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

Z:\AA-uusi-lablaatu\2-PATOLOGIA\Vastuualueen yhteiset ohjeet\Yhteiset ohjeet\Vasta-aineen verifointiraportti_Patologia_20210430.docx

LIITE 2. SF-1 -VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI



1 (3)

Ohje käytössä: Patologian vastuualueen yhteinen

VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI

Päivämäärä: 17.2.2023

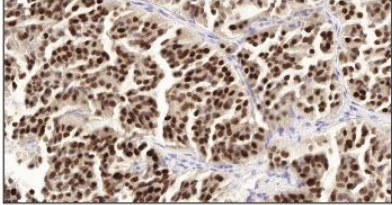
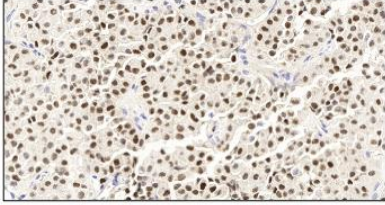
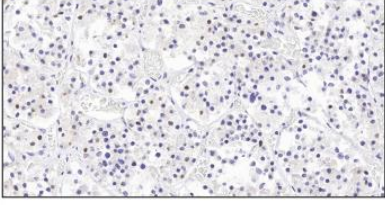
Verifiointin suorittajat/vastuuhenkilöt: Emmi Rimpioja ja sairaalasolubiologi Mia Kero sekä neuropatologian erikoislääkäri Olli Tynnenen

Vasta-aine	SF1 Klooni: EPR19744 Tuotenro: ab217317 Valmistaja: Abcam Ohjelma: 124 Laimennos: 1:500
Käyttötarkoitus	SF-1 (Steroidogenic Factor 1) on transkriptiofaktori, joka säätelee steroidogeneesiä. Markkeria ilmennetään aivolisäkkeen etulohkossa gonadotrooppi-soluissa, lisämunaisen kuoressa, munasarjoissa ja kiveksissä. Aivolisäkkeen etulohkossa SF-1 on välttämätön transkriptiofaktori LH:ta ja FSH:ta tuottavien gonadotrooppien kehitykselle. Markkeria käytetään tunnistamaan gonadotropiineja ekspressoivat aivolisäkkeen neuroendokriiniset tuumorit, ja erottamaan nollasoludenoomat hormonaalisesti mykistä tuumoreista.
Menetelmä	Optiview-kitti (Roche/Ventana)

Vasta-aineen verifiointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

Z:\AA-uusi-lablaatu\2-PATOLOGIA\Vastuualueen yhteiset ohjeet\Yhteiset ohjeet\Vasta-aineen verifiointiraportti_Patologia_20210430.docx

Ohje käytössä: Patologian vastualueen yhteinen

<p>Verifointiin käytetty materiaali</p>	<p>LH-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis). Adenoomasolut värjäytyvät positiivisesti SF-1 vasta-aineella.</p> 
	<p>LH-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis)</p>
	<p>FSH-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis). Adenoomasolut värjäytyvät positiivisesti SF-1 vasta-aineella.</p> 
	<p>FSH-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis)</p> <p>Normaali aivolisäke, gonadotropiineja ekspressoivat solut värjäytyvät positiivisesti SF-1 vasta-aineella.</p> 

Vasta-aineen verifointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

Z:\AA-uusi-lablaatu\2-PATOLOGIA\Vastualueen yhteiset ohjeet\Yhteiset ohjeet\Vasta-aineen verifointiraportti_Patologia_20210430.docx

Ohje käytössä: Patologian vastualueen yhteinen

Tulos ja sen tulkinta	Gonadotropiineja ekspressoivat solut värjäytyvät nukleaarisesti.
Menetelmän säännönmukaiset kontrollit	Aivolisäke
Kirjallisuusviitteet	<p>Asa, S.L., Mete, O., Perry, A. <i>et al.</i> Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors. <i>Endocr Pathol</i> 33, 6–26 (2022). https://doi.org/10.1007/s12022-022-09703-7</p> <p>Inoshita N. & Nishioka H. (2018). The 2017 WHO classification of pituitary adenoma: overview and comments. <i>Brain Tumor Pathology</i>, 35, 51-56</p> <p>Schimmer, B. P. & White, P. C. (2010). Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. <i>Molecular endocrinology</i>, 24(7), 1322–1337. https://doi.org/10.1210/me.2009-0519</p>

17.2.2023 / Olli Tynnenin
 Päiväys ja hyväksyjän allekirjoitus

Vasta-aineen verifointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | Laatija: Anna Raunio ja Mia Kero | Hyväksyjä:
 Päivi Heikkilä | 30.04.2021

Z:\AA-uusi-lablaatu\2-PATOLOGIA\Vastualueen yhteiset ohjeet\Yhteiset ohjeet\Vasta-aineen
 verifointiraportti_Patologia_20210430.docx

LIITE 3. T-PIT -VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI



1 (3)

Ohje käytössä: Patologian vastuualueen yhteinen

VASTA-AINEEN VERIFIOINTIRAPORTTI

Päivämäärä: 17.2.2023

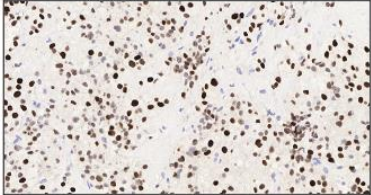
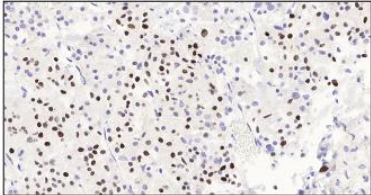
Verifiointin suorittajat/vastuuhenkilöt: Emmi Rimpioja ja sairaalasolubiologi Mia Kero sekä neuropatologian erikoislääkäri Olli Tynnenen

Vasta-aine	TPIT Kloonin: CL6251 Tuotenro: AMAb91409 Valmistaja: Atlas Antibodies Ohjelma: 107 Laimennos: 1:1000
Käyttötarkoitus	TPIT (T-box transcription factor) on transkriptiofaktori, joka ekspressoituu aivolisäkkeen etulohkossa. Proteiini säätelee kortikotropiinia tuottavien solujen erilaistumista. Markkeria käytetään tunnistamaan kortikotropiinia ekspressoivat PitNET-tuumorit, ja erottamaan nollasoluadenoomat hormonaalisesti mykistä adenoomista.
Menetelmä	Optiview-kitti (Roche/Ventana)

Vasta-aineen verifiointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

V: \Sairaaolasolubiologit\Emmi Rimpioja\TPIT.docx

Ohje käytössä: Patologian vastuualueen yhteinen

<p>Verifointiin käytetty materiaali</p>	<p>ACTH-hormonia ekspressoiva adenooma (hypophysis). Adenoomasolut värjäytyvät positiivisesti TPIT vasta-aineella.</p>  <p>ACTH-hormonia ekspressoiva adenooma, (hypophysis)</p> <p>Normaali aivolisäke, ACTH:ta ekspressoivat solut värjäytyvät positiivisesti TPIT vasta-aineella.</p> 
<p>Tulos ja sen tulkinta</p>	<p>Kortikotropiinia ekspressoivat solut värjäytyvät nuklearisesti.</p>
<p>Menetelmän säännönmukaiset kontrollit</p>	<p>Aivolisäke</p>
<p>Kirjallisuusviitteet</p>	<p>Asa, S.L., Mete, O., Perry, A. <i>et al.</i> Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors. <i>Endocr Pathol</i> 33, 6–26 (2022).</p> <p>McDonald W.C., McDonald K.N., Helmer J.A., Ho B., Wang A. & Banerji N. (2021). The role of T-box transcription factor in a pituitary</p>

Vasta-aineen verifointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

V:\Sairaalasolubiologit\Emmi Rimpioja\TPIT.docx

Ohje käytössä: Patologian vastuualueen yhteinen

	<p>adenoma diagnostic algorithm. <i>Arch Pathol Lab Med</i>, 145(5): 592–598.</p> <p>Sjöstedt, E., Bollerslev, J., Mulder, J. <i>et al.</i> (2017). A specific antibody to detect transcription factor T-Pit: a reliable marker of corticotroph cell differentiation and a tool to improve the classification of pituitary neuroendocrine tumours. <i>Acta Neuropathol</i> 134, 675–677.</p>
--	--

_____ 2023 / _____ Olli Tynninen
Päiväys ja hyväksyjän allekirjoitus

Vasta-aineen verifointiraportti | HUS Diagnostiikkakeskus | Patologia | *Laatija:* Anna Raunio ja Mia Kero | *Hyväksyjä:* Päivi Heikkilä | 30.04.2021

V: |Sairaalasolubiologit\Emmi Rimpioja\TPIT.docx