

Minna Märsy ja Johanna Pulkkinen

# Histologisten osoitusvärjäysten virhelähteet ja oppimateriaali

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

10.11.2015

Tekijät Otsikko	Minna Märsy ja Johanna Pulkkinen Histologisten osoitusvärjäysten virhelähteet ja oppimateriaali
Sivumäärä Aika	52 sivua + 10 liitettä 10.11.2015
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Sosiaali- ja terveysala
Ohjaajat	Lehtori Irma Niittymäki Bioanalyttikko Kirsi Eberhardt Bioanalyttikko Iida Salo
<p>Monet histologiset värjäykset on kehitetty jo 1800- ja 1900-luvuilla. Ne ovat tänä päivänäkin vielä käytössä, mutta monia värjäyksiä on muokattu eri tavoin. Osoitusvärjäykset, jotka tehdään usein käsin, ovat vähemmän käytettyjä ja virhealttiimpia kuin konevärjäykset. Värjäyksissä tapahtuvat virheet voivat vaikeuttaa värjättävän kudoksen rakenteiden ja ominaisuuksien tarkastelua ja näin ollen hankaloittaa huomattavasti näytteitä tulkitsevien patologioiden työskentelyä. Opinnäytetyömme tarkoituksena on selvittää seitsemän osoitusvärjäyksen yleisimmät virhelähteet ja tehdä näihin perustuva oppimateriaali. Oppimateriaalimme tulee HUSLABin Meilahden patologian laboratorion ja Metropolia Ammattikorkeakoulun käyttöön.</p> <p>Oppimateriaalia työstäessä on huomioitu erilaiset oppimistyylit. Se on tarkoitettu lähinnä itsenäiseen opiskeluun ja sisältää tätä tukevia aktiivisia kysymyksiä. Oppimateriaalimme keskittyy histologisten osoitusvärjäysten virhelähteisiin. Ennen värjäyksiä kudoksenäyte kulkee histologisen laboratorioprosessin läpi, jotta kudoksesta pystytään värjäämään ja sitä voitaisiin tarkastella mikroskoopilla. Käsittelemämme osoitusvärjäykset ovat Asetylkolinesterraasi-, Berliininsini-, Elastiset säikeet-, Gram-, Hematologinen Giemsa-, Masson-Fontana-, ja Unna-Pappenheim-värjäys. Osa näistä värjäyksistä suoritettiin käsin ja osa ArtisanLink-värjäysautomaatilla. Värjäykset sisältävät useita työvaiheita ja niissä tapahtuvat yleisimmät virhelähteet päätettiin ennalta yhdessä ohjaajiemme kanssa.</p> <p>Tuloksia tarkasteltaessa huomasimme, että virhelähteiden merkitys vaihteli huomattavasti eri värjäyksiä kesken. Osassa värjäyksistä toteutettujen virheiden merkitys näkyi voimakkaasti, kun taas joissain värjäyksissä virheiden vaikutukset olivat olemattomat. Työmme tulokset koottiin yhteen oppimateriaaliksi, jossa työmme tarkoitus ja värjäysten teoria on kerrottu lyhyesti sekä virhelähteiden tulokset on esitelty kuvien avulla.</p>	
Avainsanat	Osoitusvärjäys, histologia, oppimateriaali

Authors Title	Minna Märsy and Johanna Pulkkinen Histological staining errors and learning material
Number of Pages Date	52 pages + 10 appendices 10 November 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Health Care and Social Services
Instructors	Irma Niittymäki, Principal Lecturer Kirsi Eberhardt, Biomedical Laboratory Scientist Iida Salo, Biomedical Laboratory Scientist
<p>Many of the histological stains have been developed already in 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> century. Many of them are still used today, but lots of them have been modified. Specific stains, which are often made by hand, are less used and more exposed to errors than those done by automat. Staining errors may complicate the examination of tissues structures and cellular qualities and therefore complicate the work of pathologists. The aim of our thesis is to examine most common errors of seven specific stains and make a learning material based on them. The learning material will be put to use in HUSLAB and Metropolia university of applied sciences.</p> <p>Different kinds of learning techniques have been taken account while preparing the learning material. It is mainly intended for independent studying and includes stimulating questions in support of this. Before staining the tissue sample passes through histological laboratory process, in order that the tissue could be dyed and viewed under the microscope. The specific stains, which are elaborated in this thesis, are Acetylcholinesterase-, Prussian Blue-, Elastic Fibre-, Gram-, Hematological Giemsa-, Masson-Fontana-, and Unna-Pappenheim-staining. Some of these stains were carried out by hand and part of with ArtisanLink-staining machine. The staining process contains several phases and the most common errors in these phases were decided in advance with our instructors.</p> <p>By examining the results we noticed that the significance of the errors varied considerably between the different stains. The importance of some of the staining errors were highly reflected in the results, while some staining errors were non-existent. The results of our thesis were brought together as a learning material, in which our works purpose and theory of the stains are briefly described and results of the staining errors are presented with images.</p>	
Keywords	Specific staining, histology, learning material

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	2
2.1	Tavoitteet	2
2.2	Työn suunnittelu	3
2.3	Tutkimustehtävät	3
3	Oppimateriaali histologisten osoitusvärjäysten virhelähteistä	4
3.1	Oppimistyyli	4
3.2	Itsenäinen opiskelu	6
4	Histologian laboratorioprosessi	7
4.1	Kiinnittäminen	7
4.2	Kudosprosessointi	10
4.3	Valu ja mikrotomia	11
4.4	Värjäys	13
5	Osoitusvärjäykset ja niiden virhelähteet	14
5.1	Asetytkolinesteraasi-värjäys ja sen virhelähteet	14
5.2	Berliininsini-värjäys ja sen virhelähteet	16
5.3	Elastiset säikeet-värjäys	17
5.4	Gram-värjäys ja sen virhelähteet	18
5.5	Hematologinen giemsa-värjäys ja sen virhelähteet	19
5.6	Masson-Fontana-värjäys ja sen virhelähteet	20
5.7	Unna-Pappenheim-värjäys ja sen virhelähteet	21
5.8	ArtisanLink-värjäysautomaatti	22
5.8.1	Elastiset säikeet-värjäys ja sen virhelähteet	23
5.8.2	Berliininsini-värjäys ja sen virhelähteet	24
6	Työn toteutus	24
6.1	Kudokset, niiden käsittely, valaminen ja leikkaaminen	24
6.2	Parafiinin poisto ja näytelasien peittäminen	26
6.3	Kemikaalit	27
6.4	Jääleikkeen valmistus	27
6.5	Histologisten osoitusvärjäysten suoritus	28

6.5.1	Asetytkolinesteraasi-värjäyksen suoritus	28
6.5.2	Berliininsini-värjäyksen suoritus	29
6.5.3	Elastiset säikeet-värjäyksen suoritus	30
6.5.4	Gram-värjäyksen suoritus	30
6.5.5	Hematologisen giemsa-värjäyksen suoritus	30
6.5.6	Masson-Fontana-värjäyksen suoritus	31
6.5.7	Unna-Pappenheim-värjäyksen suoritus	31
6.6	Leikkeiden mikroskopointi ja kuvaaminen	31
7	Tulokset	31
7.1	Asetytkolinesteraasi-värjäys	32
7.2	Berliininsini-värjäys	34
7.3	Elastiset säikeet-värjäys	37
7.4	Gram-värjäys	39
7.5	Hematologinen giemsa-värjäys	41
7.6	Masson-Fontana-värjäys	44
7.7	Unna-Pappenheim-värjäys	45
7.8	Tuloksien luotettavuus	47
8	Yhteenveto	48
9	Pohdinta	49
	Lähteet	51
	Liitteet	
	Liite 1. Kemikaaliluettelo	
	Liite 2. Kanta- ja käyttöliuosluettelo	
	Liite 3. Asetytkolinesteraasi-värjäyksen protokolla	
	Liite 4. Berliininsini-värjäyksen protokolla (käsivärjäys)	
	Liite 5. Berliininsini-värjäyksen protokolla (ArtisanLink)	
	Liite 6. Elastiset säikeet-värjäyksen protokolla (ArtisanLink)	
	Liite 7. Gram-värjäyksen protokolla	
	Liite 8. Masson-Fontana-värjäyksen protokolla	
	Liite 9. Hematologisen giemsa-värjäyksen protokolla	
	Liite 10. Unna-Pappenheim-värjäyksen protokolla	

## 1 Johdanto

Histologia, eli kudosophi, on patologian osa-alue, joka tutkii kudosten rakennetta ja ominaisuuksia. Histologisilla tutkimuksilla selvitetään vainajien kuolinsyitä, potilaiden sairauksia ja ne myös auttavat hoitojen suunnitteluissa. Histologinen näytekirjo on laaja se koostuu neljästä peruskudoksesta: epiteeli-, lihas-, hermo- ja sidekudoksesta. Kudokset rakentuvat soluista, joita ei voida tarkastella ilman valomikroskooppia. Jotta solujen tietyt rakenteet ja mahdolliset muutokset pystyttäisiin erottamaan, kudokset on värjättävä. Monet histologiset värjäykset on kehitetty jo 1800- ja 1900-luvulla. Ne ovat tänä päivänäkin vielä käytössä, mutta monia värjäyksiä on muokattu eri tavoin. Väriaine absorboi valoa ja sitoutuu värjättävään kudokseen. Histologiset värjäykset perustuvat väriaineen ja kudoksen solukon kemiallisiin ominaisuuksiin. Väriaineet reagoivat kahdella tyypillisellä tavalla: ne joko yhdistyvät suoraan kudoksen kanssa, tai ne vaativat kudoksen käsittelyä peittäusaineella. (Naukkarinen 2000: 153; Suomen virtuaaliyliopisto solunetti. 2006; Histology Laboratory Manual.)

Näytteen tulkittavuuden ja tuloksen luotettavuuden varmistamiseksi histologiset värjäykset täytyy suorittaa standardoidusti. Kontrollien lisäksi on hyvä tiedostaa mahdolliset virhelähteet värjäyksiä suorittaessa. Värjäyksissä tapahtuvat virheet voivat vaikeuttaa värjättävän kudoksen rakenteiden ja ominaisuuksien tarkastelua ja näin ollen hankaloittaa huomattavasti näytteitä tulkitsevien patologioiden työskentelyä. Värjäyksissä tapahtuvat virheet voivatkin pahimmillaan johtaa väärin johtopäätöksiin ja diagnooseihin. Tämän vuoksi on tärkeää vakinaistaa hyväksi havaitut värjäysmenetelmät ja suorittaa värjäykset laadittujen ohjeistuksien mukaisesti. (Naukkarinen 2000: 153; Histology Laboratory Manual.)

Opinnäytetyömme tarkoituksena on selvittää kuuden käsin ja kahden koneellisesti tehtävän osoitusvärjäysten yleisimpiä virhelähteitä ja tehdä näihin perustuva oppimateriaali. Mietimme yleisimmät virhelähteet yhdessä ohjaajiemme Kirsi Eberhardtin ja Lida Salon kanssa. Työ suoritettiin Meilahden sairaalan patologian laboratoriossa, joka on Euroopan suurin patologian laboratorio. Tuotettava oppimateriaali tulee HUSLABin Meilahden patologian laboratorion henkilökunnan sekä Metropolia Ammattikorkeakoulun opiskelijoiden käyttöön. Osoitusvärjäykset, jotka tehdään usein käsin, ovat vähemmän käytettyjä ja virhealttiimpia kuin konevärjäykset. Patologian laboratoriossa työskentelevä henkilökunta kokee opinnäytetyöaiheemme tarpeelliseksi, jotta yleisimmät virheläh-

teet selvitetään ja raportoidaan. Oppimateriaalia olisi tarkoitus hyödyntää sekä perehdyttämässä että jokapäiväisessä itsenäisessä työskentelyssä. Opinnäytetyössämme emme käsittele kudosten solubiologisia rakenteita.

## 2 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Tässä kappaleessa kerromme työmme tavoitteet ja tarkoituksen. Käymme myös läpi lyhyesti työn suunnitteluprosessin, tutkimustehtävämme ja niiden suorittamiseen sisältyvät työvaiheet.

### 2.1 Tavoitteet

Opinnäytetyömme tavoitteena on selvittää kuuden käsin ja kahden koneellisesti suoritettavan osoitusvärjäyksen yleisimmät virhelähteet. Näiden virhelähteiden pohjalta tarkoituksemme on tuottaa selkeä ja eheä oppimateriaali Meilahden patologian laboratorion ja Metropolia Ammattikorkeakoulun käyttöön. Tavoitteena on tuottaa oppimateriaali, jota on mahdollisimman helppo käyttää esimerkiksi työpäivän aikana osoitusvärjäyksiä suorittaessa. Pyrimme ottamaan mahdollisimman edustavat kuvat eri värjäyksistä ja kudoksista. Oppimateriaaliin lisäämme teorian tietoa eri värjäyksistä sekä jokaisesta koikeilemastamme virhelähteestä. Näiden lisäksi luomme kuvien ohelle aktiivisia kysymyksiä, jotta opetusmateriaalin lukija pohtisi värjäyksen onnistumista. Lopuksi esittelemme oppimateriaalissa vielä virhelähteiden vaikutukset värjäyksiin eli käymme tulokset lyhyesti läpi.

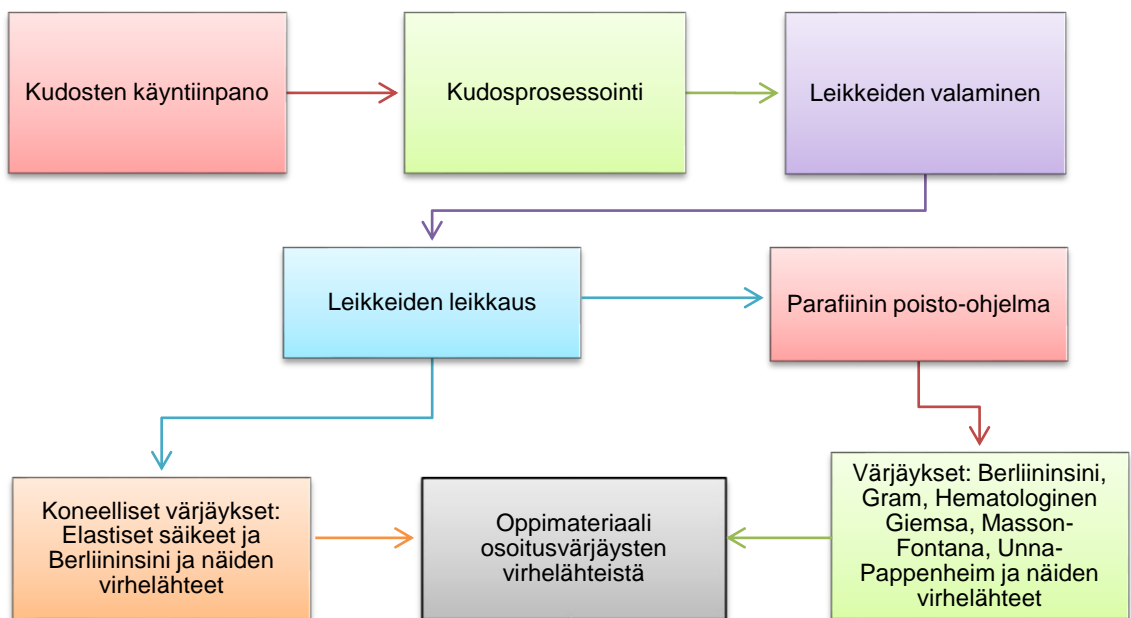
Osoitusvärjäyksiä varten tavoitteenamme on valmistaa ja leikata mahdollisimman tasa-laatuksia kudokset leikkaukselle, jotta ne olisivat vertailukelpoisia jokaisen yksittäisen värjäyksen kesken. Pyrimme standardisoimaan värjäysolosuhteet samanlaisiksi eri värjäyskerroilla, ja suorittamaan värjäykset siten, että vain virhelähdetekijä on poikkeava verrattuna oikeaan värjäysprotokollaan. Tällä tavoin toimittuamme näemme, millainen vaikutus virhelähteellä on värjäyksen kannalta. Tavoitteenamme on suorittaa värjäyksen mahdollisimman tarkasti, jotta lopputulos olisi hyvä ja opetusmateriaalia varten otetut kuvat olisivat laadukkaita. Pyrimme myös ottamaan vertailtavat kuvat mahdollisuuksien mukaan samasta kohtaa kudostenäytettä, jotta tulosten vertaileminen olisi mahdollisimman helppoa.

## 2.2 Työn suunnittelu

Opinnäytetyömme aiheen saimme HUSLABin Meilahden patologian keskuslaboratoriosta. Aiheemme pohjautuu Heidi Kemppaisen vuonna 2013 tehtyyn opinnäytetyöhön ”Histologisten konevärjäysten virhelähteet” ja siitä tuotettuun oppimateriaaliin. Koska edellä mainitussa laboratoriossa on useita käytössä olevia osoitusvärjäyksiä, jouduimme rajaamaan työhömmme seitsemän värjäystä, jottei työstämme olisi tullut liian laaja. Bioanalytikot Kirsi Eberhardt ja Iida Salo valitsivat meille mielestään työhömmme parhaiten soveltuvat värjäykset niissä mahdollisesti sattuvien virheiden perusteella. Suoritimme työhömmme liittyvän tiedonhaun ja teoreettisen osuuden kirjoittamisen suurimmaksi osaksi vuoden 2015 kesällä ja syksyllä. Työmmme empiirisen osuuden toteutimme syys- ja lokakuun aikana vuonna 2015.

## 2.3 Tutkimustehtävät

Toteutimme työmmme Meilahden patologian keskuslaboratoriossa. Suoritimme histologisen prosessin aina näytteiden käyntiänpästä värjäykseen asti itse. Kuviossa 1 esitetään opinnäytetyömmme tutkimusprosessi alusta loppuun.



Kuvio 1. Tutkimusprosessin eteneminen.



Suoritimme oikean protokollan mukaan tehdyt värjäykset HUSLABin käsivärjäystyöohjeiden mukaisesti (Liitteet 3–10). Oikean värjäysprotokollan mukaan suoritettavat värjäykset mahdollistavat hyvän vertailukohteen virheellisesti suoritettuihin värjäyksiin. Näiden avulla näemme, kuinka paljon virheellisesti suoritettavat värjäykset eroavat oikean protokollan mukaan suoritetuista värjäyksistä. Oppimateriaalissamme käymme läpi näiden värjäysten yleisimmät virhelähteet:

1. Asetytkolinesteraasi-värjäys
2. Berliininsini-värjäys
3. Gram-värjäys
4. Hematologinen giemsa-värjäys
5. Masson-Fontana-värjäys
6. Unna-Pappenheim-värjäys
7. Koneellinen berliininsini-värjäys
8. Koneellinen elastiset säikeet-värjäys

### **3 Oppimateriaali histologisten osoitusvärjäysten virhelähteistä**

Opinnäytetyön tuotoksena on tarkoitus luoda itsenäiseen opiskeluun tarkoitettu oppimateriaali histologisten osoitusvärjäysten virhelähteistä Meilahden patologian laboratorion henkilökunnan sekä Metropolia Ammattikorkeakoulun käyttöön. Oppimateriaalia on tarkoitus käyttää työntekijöiden ja opiskelijoiden perehdyttämiseen. Lisäksi se toimii jokapäiväisessä työskentelyssä tukivälineenä tarvittaessa. Oppimateriaalissa kerromme edellä mainituista värjäyksistä, työskentelyssä tapahtuvista virhelähteistä sekä luomme aktivoivat kysymykset helpottamaan oppimista. Lisäämme myös esimerkkikuvat eri kudoksista ja siitä, miltä virhelähteet värjäytyissä kudoksissa näyttävät.

#### **3.1 Oppimistyyli**

Oppimateriaalin kokoamisessa ja suunnittelussa on hyvä ottaa huomioon erilaiset oppijat ja pohtia erilaisia oppimistyyliä. Näitä erilaisia oppimistyyliä sovellamme mahdollisimman monipuolisesti oppimismateriaalin valmistamisessa, ottaen huomioon mahdollisimman monet eri oppimistyyli. Tämä siksi, että jokainen oppimisprosessia läpi käyvä

oppija vastaanottaa ja prosessoi uutta tietoa eri tavoin. Oman oppimisen kannalta on siis tärkeää tiedostaa millä tavoin itse oppii parhaiten. Tällöin oppiminen on tehokkaampaa ja mielekkäämpää. (Itä-Suomen yliopisto 2015; Koponen 2010: 5–6.)

Oppiminen on käsitteenä laaja. Yksinkertaisimmillaan oppimisen voi selittää uuden tiedon vastaanottamisena ja varastoimisena muistiin. Jokainen oppija omaksuu uutta tietoa yksilöllisesti ja näitä tapoja selitetään erilaisilla oppimistyyyleillä. Jokaisen oppijan yksilöllinen oppimistyyli rakentuu useista eri osatekijöistä. Oppimiseen sisältyy toimintaa, joka on paljon monimutkaisempaa kuin pelkkä tiedon varastoiminen. Oppimisprosessissa oppija soveltaa ja sulauttaa uuden tiedon jo aikaisemmin oppimaansa. Muokatessaan ja käsitellessään jo hankittua tietoa ja uutta ainesta, oppija muodostaa täysin uusia toimintamalleja ja tietorakenteita itselleen. Omia oppimistyyliä olisi hyvä pohjata ja kehittää. Tavoitteellisesti pitäisi pyrkiä löytämään itselleen sopiva ja mahdollisimman monipuolinen sekä laaja oppimistyyli, jolloin oppija pystyisi käyttämään myös heikoimpia oppimistyyliään itselle poikkeavissa oppimistilanteissa. (Engeström 1987: 18–19; Itä-Suomen yliopisto 2015; Koponen 2010: 6.)

Oppimistyyliä voidaan jaotella eri tavoin. Aktiivinen oppija omaksuu tietoa parhaiten osallistumalla itse ja haastamalla itseään. Oppiminen tapahtuu parhaiten lyhytaikaisessa ja nopeatahtisessa oppimistilanteessa, jossa aktiivinen oppija pääsee itse toimimaan. Opinnäytetyössämme tuomme tätä oppimistyyliä esille luomalla aktivoivia kysymyksiä, jolloin oppija voi oppimismateriaalia lukiessaan esimerkiksi kirjata samalla vastaukset aktivoiviin kysymyksiin. Käytännön toteuttaja taas oppii tekemällä ja harjoittelemalla, ja soveltaa uusia asioita ja tietoa helposti käytäntöön. Muiden työskentelyn seuraaminen ja sitä kautta itsensä kehittäminen edesauttaa käytännön toteuttajan oppimista. Lisäksi keskustelujen käyminen asiasta ja opettaminen eli opitun asian selittäminen toiselle henkilölle parantaa uuden asian ymmärtämistä. (Itä-Suomen yliopisto 2015.)

Loogisen oppijan oppimistyyli painottuu pitkälti teorioiden, käsitteiden ja erilaisten mallien varaan. Loogisen ajattelijan oppimistyyliin kuuluu tyypillisesti tutustua ja edetä uuden asian oppimisessa loogisesti yksityiskohdista kokonaisuuteen. Tutkiminen, pohtiminen ja päättely ovat tällaiselle oppijalle mielekkäitä, eikä hän toimi mielellään suunnitelmattomasti tai ilman selkeää päämäärää. Neljäntenä oppimistyylinä on harkitseva tarkkailija. Tällaisen optimaaliseen oppimistyyliin kuuluu tarkkailun lisäksi asioiden pohtiminen ja analysointi. Hän on oppijana hyvin itsenäinen ja rauhallisesti etene-

vä. Parhaiten harkitseva oppija omaksuu uutta tietoa tarkkailemalla sivusta ja huomioidulla asioita. (Itä-Suomen yliopisto 2015; Koponen 2010: 7.)

Erilaiset oppimistyyliä voidaan jaotella aistien mukaan, eli millä aistilla oppija omaksuu parhaiten uutta tietoa. Auditivisen oppijan oppima tieto perustuu kuulohavaintoon. Auditivisesti oppiva henkilön mieleen painuu esimerkiksi puheet, puhutut luentoesitykset ja keskustelut. Oppimisprosessin kehittämiseksi tällä tavoin oppiva voi hyödyntää esimerkiksi äänitettuja tallenteita. Kinesteettisesti oppivan henkilön kannattaa yhdistää liikunta ja oppiminen, sillä hän oppii parhaiten asioita kun voi itse liikkua samalla. Kinesteettinen oppija on yleensä aktiivinen ja tekee mielellään itse asioita oppiakseen, hänen oppiminen perustuu siis hyvin paljon kehon liikkeeseen ja kostutukseen. Visuaalinen oppija omaksuu uutta tietoa parhaiten näkemällä itse. Hänen mieleensä saattaa helposti painua erilaisia kuvioita ja kaavoja. Tämän lisäksi esimerkiksi mielikuvat ja värit ovat tärkeitä visuaalisen oppijan oppimisprosessissa. Visuaalisesti oppivalle henkilölle on tyypillistä, että hän muistaa esimerkiksi missä kohtaa sivua jokin asia on mainittu, mutta sisällön tarkkuus voi jäädä hyvinkin vajaaksi. Viimeinen aistien mukaan jaettu oppimistyyli on taktillinen oppimistyyli. Oppiminen perustuu käsin koskemiseen ja kokeiluun, ja oppimisvälineinä voi toimia esimerkiksi muistiinpanojen kirjoittaminen tai piirtäminen. Kosketusaistien välityksellä oppimiseen liittyy usein myös liikkuminen, jolloin nämä kaksi asiaa kytkeytyvät toisiinsa. (Koponen 2010: 6–7.)

### 3.2 Itsenäinen opiskelu

Yksi opinnäytetyömme tavoitteista on tuottaa oppimateriaali histologisten osoitusvärijäysten virhelähteistä itsenäiseen opiskeluun. Itsenäinen opiskelija työskentelee yksin, itse tietoa ja aineistoa hakien, muokaten sitä omaehtoisesti ja itseään varten. Oppimisprosessi etenee itsenäisen opiskelijan oman oppimissuunnitelman mukaan ilman paikka- tai aikasidonnaisia tekijöitä. Itseopiskelulle ei siis ole määritelty minkäänlaista vähimmäiskestoja. Itseopiskelun muotoja on lukematon määrä, riippuen jokaisen itseopiskelijan tarpeista ja kyvyistä. Niitä yhdistää kuitenkin kaikki itsenäistä ajattelua ja toimintaa vaativat tehtävät. Itseopiskelumuotoja ovat esimerkiksi asioiden pohtiminen, tiedonhankkiminen ja sen lukeminen, videoiden katselu, asioiden muistiinpano-, esimerkiksi oppimispäiväkirjojen, muodossa, toiminnallisten tehtävien teko ja esseeluonteinen kirjoittaminen. Itsenäinen opiskelija vastaa itse opetusjärjestelyistä ja oppimisesta, mikä saatetaan usein kokea haasteena itseopiskelussa. (Virtuaali-ammattikorkeakoulu; Tilastokeskus.)

## 4 Histologian laboratoriosesssi

Jokainen histologinen kudoksenäyte käy läpi tietyn prosessin ennen kuin se päätyy mikroskoopin alle patologin tarkasteltavaksi. Seuraavissa kappaleissa käymme läpi histologisen prosessin kudoksen kiinnittämisestä aina värjäämiseen saakka.

### 4.1 Kiinnittäminen

Kudoksen fiksointi eli kiinnittäminen suoritetaan heti ensimmäisenä kudoksen irrottamisen jälkeen. Se on näytteenvalmistuksen tärkein vaihe. Sen ydintarkoituksena on säilyttää kudoksen rakenteeltaan ja ulkonäöltään mahdollisimman samanlaisena kuin se on ollut ennen irrottamistaan. Kiinnittämistä käytetään solun aineenvaihdunnan pysäyttämiseen, solujen ja kudoksen entsyymaattisen alentumisen eli autolyysin torjumiseen, patogeenisten mikro-organismien kuten bakteerien, virusten ja sienien tuhoamiseen ja kudoksen kovettamiseen. Kudoksen täytyy käsitellä myös siksi, että siitä saadaan leikattua valonläpäisevä ohut leike mikroskooppista tutkimusta varten. (Ross – Pawlina 2006: 2; Karttunen – Soini – Vuopala 2005: 288.)

Kudoksen kiinnittämisessä on kaksi päätapaa: fysikaalinen ja kemiallinen kiinnitys. Fysikaalisessa kiinnityksessä solukko jäädytetään nopeasti vähintään -40 °C:een, jonka jälkeen näyte leikataan näytelasille -20 °C:ssa. Tätä menetelmää käytetään muun muassa biopsianäytteissä, jolloin vastaus on saatava nopeasti, esimerkiksi potilaan ollessa leikkauspöydällä. Fysikaalinen kiinnitys on toimiva menetelmä myös eräissä histokemiallisissa ja immunosytokemiallisissa tutkimuksissa. Tämä johtuu sen kyvystä pysäyttää solun toiminnot nopeammin kuin kemiallinen kiinnitys. (Suomen virtuaaliyliopisto solunetti. 2006.)

Kemiallinen kiinnitys jaetaan kahteen eri menetelmään: immersioinnitykseen ja perfuusiokinnitykseen. Immersioinnitys voidaan tehdä kuolleesta tai elävästä organismista kerättyyn näytteeseen. Kudoksenäyte upotetaan heti irrotuksen jälkeen kiinnitysaineeseen eli fiksaatiiviin. Perfuusiokinnityksessä ruiskutetaan suoraan sydämeen tai aorttaan fiksaatiivia. Näin fiksaatiivi leviää kapillaarien avulla verenkiertoon ja näin elimistön kaikkiin soluihin. (Suomen virtuaaliyliopisto solunetti. 2006.)

Kiinnittämisen lopputulokseen voi vaikuttaa useat tekijät. Näitä ovat puskuri, läpäisykyky, voimakkuus, lämpötila, konsentraatio ja kiinnittämissaika. Paras lopputulos kiinnittämisessä saadaan liuoksen pH:n ollessa lähes neutraali. Kudoksen hypoksia alentaa pH-arvoa, jonka vuoksi fiksatiivissa tulisi olla puskurointikapasiteettia ylenmääräisen happamuuden ehkäisemiseksi. Ylimääräinen happamuus saa aikaan formaliini-hemipigmentin muodostumista. Tämä ilmenee mustana, polarisoituneena sakkana kudoksessa. Kudoksen läpäisevyys riippuu fiksatiivin leviämiskyvystä. Parhaita fiksatiiveja kudosläpäisevyytensä kannalta ovat formaliini ja alkoholi, huonoin on glutaraldehydi. Läpäisevyyttä voi edistää jakamalla kudospalat ohuisiin paloihin, jolloin fiksatiivi läpäisee kudoksen nopeammin. (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.)

Fiksatiivin tilavuuden tulisi olla vähintään 10-kertainen kudospalteen tilavuuteen nähden. Useat fiksatiivit, kuten NBF (neutral-buffer formalin) läpäisevät kudosta noin 1 mm tunnissa. Lämpötilan kasvaessa molekyylien diffuusio suurenee, mikä johtuu niiden nopeasta liikkeestä ja värinästä. Tämän vuoksi lämpötilan kasvaessa kudoksen läpäisevyys kasvaa. Koska useat kemialliset reaktiot nopeutuvat lämpötilan kasvaessa, myös formaldehydi reagoi nopeammin proteiinien kanssa suuremmassa lämpötilassa. Fiksatiivin liukoisuus ja tehokkuus määrittävät fiksatiivin sopivan pitoisuuden. Alle 10 %:n pitoisuudet formaliinissa aiheuttavat kudoksen kovettumista ja kutistumista ja etanolin 70-prosenttia pienemmät pitoisuudet eivät poista vettä kudoksesta tarpeeksi tehokkaasti. Liian korkea pitoisuus voi sen sijaan vaikuttaa kudoksen rakenteeseen ja tuottaa artefakteja. (Bancroft – Gamble 2008: 63; The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.)

Useat kemikaalit tai kemikaalien yhdistelmät voivat toimia hyvinä fiksatiiveina. Fiksatiivit perustuvat niiden erilaisiin toimintamekanismeihin: ne voivat muodostaa proteiinien välille kovalenttisiä sidoksia, poistaa vapaita nesteitä kudoksesta ja denaturoida proteiineja ja aminohappoja pH-muutoksilla. Fiksatiivit jaetaan näiden toimintamekanismien mukaan viiteen luokkaan: aldehydit, elohopeat, alkoholit, hapettavat aineet ja pikraatit. (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.)

Aldehydeihin kuuluvat formaldehydi ja glutaraldehydi. Formaliini on yleisimmin käytetty fiksatiivi. Se on vesiliukoinen, noin 37-prosenttia formaldehydiä sisältävä liuos, joka sisältää myös useita laimennoksia, puskureita ja muita kemikaaleja. Se säilyttää solu-

jen ja niiden ulkopuolisten komponenttien yleisen rakenteen reagoimalla proteiinien aminoryhmien kanssa. Koska formaliini ei muuta aminoryhmien kolmiulotteista rakennetta merkittävästi, proteiinit säilyttävät niiden kykynsä reagoida spesifien vasta-aineiden kanssa. Tämä ominaisuus on erityisen tärkeää immunosytokemiallisissa värjäyksissä. Diagnostisessa patologiassa käytetään yleisimmin 10-prosenttista formaliinia, joka on fosfaattipuskuroitua ja pH-arvoltaan 7. Formaliini läpäisee kudoksen hyvin, mutta melko hitaasti. Se ei kuitenkaan reagoi lipidien kanssa, joten se on heikko solukalvojen fiksatiivi. (Ross – Pawlina 2006: 2; The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.)



Kuvio 2. Formaliinilla kiinnitetyn kudospalan (suoli) käyntiinpano.

Glutaraldehydin biologisista vaikutuksista ja reaktioista tiedetään vähemmän verrattuna formaldehydiin ja sitä ei ole käytetty yhtä laajasti. Se on bifunktionaalinen, eli kaksi funktionaalista ryhmää sisältävä aldehydi, jonka ansiosta se pystyy säilyttämään proteiinien rakenneosat muodostamalla kovalenttisiä sidoksia niiden välille. Glutaraldehydi on hyvä fiksatiivi, kun kudosta halutaan tarkastella elektronimikroskoopilla. Kudoksen pienimpien yksityiskohtien säilyminen on tällöin tärkeää ja glutaraldehydifiksatiivin jälkeen lisätäänkin vielä puskuroitu osmiumtetroksidi, joka säilyttää ja värjää rasvoja ja proteiineja. Glutaraldehydi läpäisee kudoksen hitaasti, jonka vuoksi siinä kiinnitettävien kudosten tulisi olla alle 0,5 mm paksuisia. Se ei reagoi hiilihydraattien tai lipidien kanssa elleivät ne sisällä vapaita aminoryhmiä, kuten joissain fosfolipideissä on. (Bancroft – Gamble 2008: 59; Junqueira – Carneiro – Kelley 1995: 1.)

Elohopeafiksatiivien mekanisme ei tunneta hyvin. Ne sisältävät elohopeakloridia, joka reagoi ammoniumsuolojen, amiinien, amidien, aminohappojen ja sulfhydryyliryhmien kanssa ja kovettavat kudosta. Elohopeafiksatiivit läpäisevät kudoksen hitaasti. Niitä ei käytetä enää yleisesti kuin joissain laboratorioissa hematopoeettisten kudosten fiksointiin. (Bancroft – Gamble 2008: 70–71.)

Dehydroivia fiksatiiveja ovat etanoli, metanoli ja asetoni. Ne poistavat kudoksesta vettä ja muuttavat proteiinien tertiäärirakenteita, joka johtaa niiden saostumiseen. Ne eivät vaikuta nukleinihappojen rakenteeseen. Alkoholit kuitenkin tuhoavat solujen yksityiskohtaiset rakenteet, koska ne liuottavat kudoksen rasvoja. Tämä johtaa kudoksen kutistumiseen ja haurastumiseen jo 3–4 tunnissa. Alkoholit ovatkin parempi fiksatiivi sytologisille näytteille. Alkoholeja voidaan myös käyttää yhdistelmäfiksatiiveissa. Esimerkiksi etanolin ja formaldehydin yhdistelmä, alkoholiformaliini, sopii hyvin rintakudoksen fiksointiin jolloin lipidien liukeneminen kudoksesta helpottaa imusolmukkeiden tunnistamista. (Bancroft – Gamble 2008: 70–71.)

#### 4.2 Kudosprosessointi

Jotta kudoksista voitaisiin leikata ohuita leikkeitä mikroskooppista tarkastelua varten, kudoksien sisältämä vesi tulee korvata tukiaineella. Tämä tekee kudoksen koostumuksesta kiinteän ja näin ollen helpottaa leikkaamista. Kudosprosessointi sisältää usein kaksi vaihetta: dehydraation eli veden poiston ja kirkastamisen. (Junqueira 1995: 2.)

Dehydraatio poistaa sitoutumattoman veden ja vesipohjaiset fiksatiivit kudoksesta. Vesi ja vesipohjaiset fiksatiivit, kuten 10-prosenttinen formaliini, eristetään ensin nousevalla alkoholisarjalla. Liiallinen dehydraatio aiheuttaa kudoksen kovettumista, kutistumista ja haurastumista, kun taas riittämätön dehydraatio estää kirkastavien liuottimien imeytymisen kudokseen, jättäen sen pehmeäksi. Dehydroivia aineita ovat etanoli, etanoliasetoni, metanoli, isopropyyli, glykoli ja denaturoidut alkoholit. Käytetyin näistä on etanoli. Dehydraatio kestää yleensä noin 6-24 tuntia, riippuen kudoksen koosta. (Bancroft – Gamble 2008: 84–85; Junqueira 1995: 2–3.)

Alkoholi, useimmiten etanoli, korvataan dehydraation jälkeen liuottimella, joka ”kirkastaa” kudoksen tehden siitä läpikuultavan. Sopivan kirkastusaineen valinnan kriteerejä ovat dehydraatioaineen nopea poisto, parafiinin poiston helppous, minimaalinen kudoksen vaurioittaminen, syttyvyys, toksisuus ja hinta. Yleisimmin käytetty kirkastin on

ksyleeni, koska se sekoittuu alkoholin ja parafiinin kanssa. Käytetyin kudoksen tukiaine on parafiini. Kudos kyllästetään parafiiniin, mikä muodostaa välimassan estäen häiriöt kudoksen rakenteessa. Tämä on tärkeää mikrotomian aikana. Parafiinin sulamispiste vaihtelee +40–70 °C:een välillä: alhaisessa sulamispisteessä parafiini on yleensä pehmeämpää ja korkeammassa kovempaa mikä voi vaikuttaa mikrotomiaan. Kirkastamisvaihe kestää noin yhdestä kuuteen tuntia. (Bancroft – Gamble 2008: 85–87; Junqueira 1995: 3.)

Kudosprosessointi voidaan tehdä automaatiolla tai manuaalisesti. HUSLABissa kudosprosessointi suoritetaan automaation avulla, koska näytemäärä on liian suuri suoritettavaksi manuaalisesti. Kudosprosessointi kestää yleensä yön yli.

### 4.3 Valu ja mikrotomia

Kudosprosessoinnin jälkeen näytteet valetaan sulalla parafiinilla kudoskasetteihin kiinni. Näytepala asetetaan metalliseen muottiin, jonka jälkeen sen päälle valutetaan sulaa parafiinia. Muotin päälle asetetaan kudosprosessoinnissa käytetty kasetti, joka valetaan parafiinilla kiinni muottiin. Parafiinin annetaan jähmettyä kylmällä levyllä, jonka jälkeen muodostunut kudosblokki voidaan irrottaa metallimuotista, ja jäljelle jää vain kudoskasetissa kiinni oleva parafiiniin valettu näyte. Tärkeintä valussa on saada näytepala asetettua tiiviisti ja tasaisesti muotin pohjalle, jotta kudospala ei jäisi eri tasoihin. Valamisen jälkeen kudosblokista trimmataan vielä ylimääräiset parafiinit pois, jotta blokki pysyisi hyvin mikrotomissa leikkaamisen aikana.

Jotta kudoksenäytteitä voidaan tarkastella mikroskoopilla, tulee kudosleikkeiden olla ohuita ja valoa läpäiseviä. Kudoksenäytteiden leikkaaminen tapahtuu mikrotomilla. Se liikuttaa kudosblokkia pystysuoraan, kunnes blokki kohtaa terän. Terä leikkaa kudosblokista ennalta määriteltäviä, usein 2–3 µm paksuisia leikkeitä. Kudosleike siirretään leikkaamisen jälkeen pensseleiden avulla ensin kylmään ja sitten lämpimään veteen, joissa kudosleike hieman laajenee ja suoristuu. Leike poimitaan objektilasille, joka siirretään lyhyen kuivattamisen jälkeen lämpölevylle. Sen lämpötilan tulisi olla noin +40–70 °C:ta, eli lähellä parafiinin sulamispistettä. Näin leike saadaan kiinnitettyä lasille värjäystä varten. Leikkeiden onnistumiseen voi vaikuttaa kudosblokin lämpötila, terän laatu ja asento, leikkausnopeus, leikepaksuus, kudoksen laatu, leikkauskulma ja kudosleikkeen valu. (Bancroft – Gamble 2008: 93–97.)





Kuvio 3. Kudosnäytteen valaminen parafiiniin ja leikkaaminen vesiliukumikrotomilla.

Kudosta voidaan leikata myös ilman pitkäkestoista kudospesointia. Tällöin tuoreesta, käsittelemättömästä kudoksesta valmistetaan jääleikkeet. Jääleikkeitä voidaan pyytää esimerkiksi kirurgisessa patologiassa, jossa leikkeen on valmistettava nopeasti. Tuore kudospala asetetaan metalliselle ”napille”, jonka jälkeen kudospalan ympärille levitetään OCT-geeliä. Kudospala jäädyytetään nopeasti  $-190\text{ °C}$ :ssa nestemäisessä työssä.

Jääleikkeen leikkaamisen periaate on hyvin yksinkertainen: kun kudoksesta on jäänyt, kudoksessa oleva neste muuttuu jääksi jolloin kudoksesta tulee kiinteä. Tällöin jäänyt neste toimii kudoksen tukiaineena. Jääleikkeet leikataan kryostaatilla, eli kylmämikrotomilla, joka pitää jäädytyksen avulla jääleikkeen kylmänä. Kryostaatin sisälämpötila on noin  $-15\text{ – }-20\text{ °C}$ :ta. Leikkaamisen jälkeen kudospala sulatetaan ja kudospala käy läpi normaalin kudospesoinnin. (Bancroft 2008 – Gamble: 98–100.)



Kuvio 4. Valmis jääleikenappi.

#### 4.4 Värjäys

Kudosnäytteiden tutkiminen valomikroskoopilla edellyttää näytteiden värjäämistä histologisilla värjäyksillä. Niiden tarkoituksena ei ole ainoastaan saada väritön kudos näkyviin, vaan myös saada sen eri rakenteet erottumaan. Tätä varten käytetään selektiivisiä väriaineita, jotka sitoutuvat kudoksen solukkoon kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Kudoksia voidaan värjätä kolmella eri menetelmällä: väriaineilla värjäämällä, metallisuoloilla kyllästämällä ja synnyttämällä värillisiä yhdisteitä kemiallisia reaktioita hyväksikäyttäen. (Bancroft – Cook 1994: 17; Suomen Virtuaaliyliopisto solunetti. 2006.)

Useimmat väriaineet ovat aromaattisia yhdisteitä, jotka sisältävät bentseenirenkaita. Bentseenirenkaan väriä antavaa ryhmää kutsutaan kromoforiksi. Se muuttaa yhdisteen valon resonointiominaisuuksia, jolloin valkoisen värin läpäistessä kudoksen syntyy erilaista absorbointia. Jotta yhdiste pystyisi sitoutumaan värjättävään kudokseen, tarvitaan myös auksokromeja. Tärkeitä auksokromeja ovat anioniset karboksyyli- ja hydroksyyli-ryhmät ja kationiset aminoryhmät. (Bancroft – Cook 1994: 18–19.)

Väriaineet sitoutuvat kudokseen eri mekanismeilla. Useimmiten kudospärit sitoutuvat kudokseen sähkövarauksen avulla. Kationinen väri sitoutuu anioniin kudoksen osiin, kuten nukleinihappoihin, tai käänteisesti anioniset väriaineet sitoutuvat kationisiin rakenteisiin. Väriaineet voivat sitoutua kudokseen myös vetysidoksilla, kovalenttisilla sidoksilla tai van der Waalsin voimia hyväksikäyttäen. (Bancroft – Gamble 1994: 17–20;

Junqueira 1995: 2.) Useat väriaineet käyttäytyvät kuten happamat tai emäksiset kemialliset yhdisteet ja niillä on taipumus muodostaa sähköstaattisia sidoksia kudoksen ionisoituvien radikaalien kanssa. Kudoksenkomponentteja, jotka sitovat mieluummin emäksisiä väriaineita, kutsutaan basofiiliseksi. Puolestaan happamia väriaineita sitovia kudoksenkomponentteja kutsutaan asidofiiliseksi. (Junqueira 1995: 2.)

Värjääminen voi olla progressiivista tai regressiivistä. Progressiivisessa värjäyksessä kudosta värjätään kunnes sille saadaan sopiva värikylläisyys. Regressiivisessä värjäyksessä kudosta ylivärjätään ensin, jonka jälkeen väriä pestään pois kunnes tavoiteltu värjäysintensiteetti on saavutettu. Väriin poistamiseen käytetään differointiliuosta, joka on hapanta tai emäksistä väristä riippuen. (Suomen Virtuaaliyliopisto solunetti. 2006.)

## 5 Osoitusvärjykset ja niiden virhelähteet

Histologiset osoitusvärjykset ovat usein vähemmän käytettyjä ja erityislaatuisia värjäksiä, joiden tehtävänä on osoittaa jonkin tietyn komponentin, kuten esimerkiksi raudan tai melaniinin, pitoisuutta kudoksessa. Tarkoituksemme opinnäytetyössä on selvittää osoitusvärjäysten virhelähteet. Värjäyksissä toteutettavat virheet mietimme yhdessä Iida Salon ja Kirsi Eberhardtin kanssa. Nämä virheet he totesivat yleisimmin tapahtuviksi värjäksiä suorittaessa. Seuraavissa kappaleissa esittelemme seitsemän erilaista histologista osoitusvärjäystä ja käymme läpi kaikkien värjäysten virhelähteet.

### 5.1 Asetylkolinesteraasi-värjäys ja sen virhelähteet

Yksi värjäysmenetelmistä, jota käsittelemme opinnäytetyössämme on asetylkolinesteraasi-värjäys. Asetylkolinesteraasi on entsyymi, joka löydettiin aikanaan hermostosta ja lihaskudoksista. Tällä värjäysmenetelmällä voidaan diagnosoida hyvin erityisesti Hirschsprungin tauti eli synnynnäinen segmentaalinen aganglioneosi. Paksusuolen hermotuksen kehitys alkaa jo varhain sikiökehityksessä. Normaalisti toimivassa suolistossa koolonissa ja rektumissa uloimman suolenseinämän lihaksien välissä on gangliosoluja. Nämä gangliosolut yhdessä niihin liittyvien hermosolujen kanssa huolehtivat paksusuolen liikkuvuudesta eli peristaltiikasta. Hirschsprungin tauti on vastasyntyneiden suolitukkeuman yleisin syy. Tässä taudissa paksusuolen anaaliosan hermosäikeet ovat kehittymättömiä ja puutteellisia. Virheellisesti kehittyneessä suolessa ei

ole peristaltiikkaa, mikä aiheuttaa suolen sisällön liikkumiselle vaikeuksia ja näin ollen suoli tukkeutuu. Tämän seurauksena syntyy taudin tyyppioire eli ummetus. Tämän lisäksi muutaman päivän ikäisillä lapsilla saattaa alkaa ilmaantua oksentelua. Hirschsprungin tauti on hyvin harvinainen, ja sen takia taudin etiologiakin on tuntematon. Hoitona Hirschsprungin taudille on aganglionisen suolen osan poisto kirurgisesti. (Mäkinen – Carpen – Kosma – Lehto – Paavonen 2012: 671; Bancroft – Cook 1994: 310; Kekomäki – Rapola – Louhimo 1979: 292–294; Suvarna ym. 2013: 573–574; Yadav – Kini – Das – Mohanty – Puttegowda 2014.)

Hirschsprungin taudin diagnoosi voidaan tehdä kliinisesti tai radiologisesti, mutta useimmiten siihen vaaditaan histologista tietoa. Eli usein otetaan yksi tai useampi biopsianäyte peräsuolen limakalvolta. Diagnoosi perustuu gangliosolujen puuttumisen osoittamiseen vioittuneen suolen kohdalta. Normaalisti suoliston mukoosisolut eivät värjäydy yleisesti asetylkolinesteraasilla, jota käytetään kyseisessä värjäyksessä substraattina. Värjäyksessä asetylkolinesteraasi hydrolysoi asetyltiokoliiniin ja reaktiotuotteena syntyy tiokoliinia. Reaktiotuotteena syntynyt tiokoliini muodostaa ferrosyanidia saostamalla kuparoidun ferrisyanidin. Suolen limakalvon asetylkolinesteraasiaktiiviset hermosolut ja -säikeet, eli ne jotka sisältävät asetylkolinesteraasia, värjäytyvät tumman ruskeasta mustiin sävyihin. Värjäys suoritetaan yleensä ammoniumsulfidiliuoksessa, jotta entsyymiaktiivisuus saadaan ilmentymään kunnolla. (Mäkinen ym. 2012: 671; Bancroft – Cook 1994: 310; Moore – Johnson 2005; Suvarna ym. 2013: 573–574.)

Asetylokolinesteraasi-värjäyksessä käytettävä substraattiliuos säilytetään normaalisti -70 °C:ssa. Yksi virhelähteemme onkin säilyttänyt ACE-liuos huoneenlämmössä neljä kuukautta ennen värjäyksen suorittamista. Lisäksi teemme käyttöliuoksen 1 huoneenlämmössä neljä kuukautta vanhennetuista ACE- ja inkubaatioliuos B:stä. Asetylokolinesteraasi-värjäystä varten tarvitaan aina histologinen tuorenäyte, josta leikataan jääleiketekniikalla leikkeet lasille. Värjäystä varten tarvitaan tuorenäyte, koska näytteestä värjäyksellä osoitettava asetylokolinesteraasi on entsyymi, joka hajoaa fiksoidussa kudoksessa. Asetylokolinesteraasi-värjäyksessä on tärkeää aloittaa värjäys tunnin sisällä jääleikkeen leikkaamisesta. Virhelähteemme on myös vanhentuneet näytelasit, eli värjäämme viiden ja yhden viikon vanhoja laseja, sekä lisäksi vielä kaksi tuntia vanhat lasit. (Eberhardt – Salo 2015; Mäkinen ym. 2012: 672.)

## 5.2 Berliininsini-värjäys ja sen virhelähteet

Berliininsini-värjäyksellä voidaan osoittaa kudoksen rautapitoisuutta. Elimistön rauta on sitoutunut erilaisiin proteiinimolekyyleihin. Suurin osa elimistön raudasta on sitoutunut hemoglobiineihin, joiden avulla se pääsee kulkeutumaan elimistön hyödynnettäväksi. Elimistön kokonaisrautapitoisuudesta 60 % on punasoluihin sitoutuneissa hemoglobiinimolekyyleissä. Rautaa varastoivat ferritiini ja hemosideriini proteiinit. Ferritiiniä on kaikissa elimissä, mutta runsaimmin maksassa ja luuytimessä. Hemosideriiniä on normaalissa tilassa vain pernassa, luuytimessä ja maksan Kupfferin soluissa. Rauta varastoituu elimistöön kolmiarvoisena ferri-muotona. Rautaa on myös myoglobiineissa, sekä tietyissä entsyymeissä, kuten sytokromioksideasissa ja peroksidaasissa. Raudan tärkein varastoitumispaikka on luuydin, jossa se myös yhdistetään hemoglobiinimolekyylisiin punasolujen muodostumisen aikana. Rautavärjäystä käytetäänkin yleisimmin luuydintutkimusten yhteydessä, ja se tehdään aina rutiinomaisesti MGG-värjäyksen lisäksi. (Mäkinen ym. 2012: 146; Naukkarinen 2000: 158; Suvana – Layton – Bancroft 2013: 240.)

Raudan ylimäärä elimistön normaalitilassa ei ole yleistä, koska suolisto ei takaisin imeytä rautaa tarpeetta. Tilanne on toinen, mikäli rautaa annetaan elimistöön rautainjektioina tai verensiirron välityksellä. Tällöin rautavarastot saattavat ylittyä ja liiallinen hemosideriinin määrä varastoituu elimiin näkyvinä retikuloendoteliakomponentteina. Tätä elimistön tilaa kutsutaan hemosiderroosiksi. Tällöin rautaa kertyy runsaasti elimistöön muun muassa ihoon, haimaan ja munuaisiin. Hemosiderroosi ei välttämättä vahingoita kudoksen soluja. Rautavärjättyä luuydinnäytettä mikroskopoidessa nähdään rautavarastot eli makrofagien ja endoteelisolujen sisältämä hemosideriini. Tämän lisäksi nähdään erytroblastit, jotka sisältävät hemosideriinigranuloita. Raudan kertymän harvinaisempi vaikutus on hemokromatoosi, jossa ohutsuolen säännöstelymekanismi on häiriintynyt, jolloin rauta absorboituu takaisin ja siirtyy elimistön rautavarastoihin. Mikäli rautaylimäärä varastoituu moniin elimiin usein, voi se aiheuttaa rakenteellisia vaurioita ja toiminnallisia häiriöitä. Hematokromatoosi on perinnöllinen tauti ja siihen liittyy myös suurentunut maksasyövän riski. (Mäkinen ym. 2012: 146; Naukkarinen 2000: 158–159; Suvana ym. 2013: 240.)

Berliininsini-värjäyksessä fiksatiivina suositellaan käytettävän mahdollisimman vähän happoa sisältäviä fiksatiiveja. Fiksatiivit, jotka sisältävät runsaasti happoja eivätkä yhtään formaliinia, voivat poistaa näytteestä hemosideriinin kokonaan tai muuttaa sitä

niin, että reaktiot ilmentyvät negatiivisina. Tietyn tyyppiset rautalöydökset kudoksissa eivät ole todistettavissa perinteisillä menetelmillä, sillä ne ovat tiukasti sitoutuneet proteiini-komplekseihin. Tällaisia rautalöydöksiä ovat esimerkiksi hemoglobiini ja myoglobiini, jotka voidaan osoittaa raudan vapautuessa vetyperoksidikäsitelyllä berliininsini-värjäyksessä. (Suvana ym. 2013: 240.)

Berliininsini-värjäyksessä on tärkeää käyttää jokaisen potilasnäytteen kanssa positiivista kontrollia. Värjäyksessä ferrosyanidihappoliuoksella kudoksen proteiineista irrotetaan ferri-ionit laimeassa suolahappoliuoksessa. Ferrosyanidiliuoksen tulisi olla mielellään valmistettu juuri ennen sen käyttämistä. Ferri-ionit reagoivat kaliumferrosyanidiliuoksen kanssa ja reaktiotuotteena muodostuu liukenematon sininen yhdiste ferriferrosyanidi eli berliininsini. Eli värjäyksen nimenkin mukaisesti ferri-rautajyvät värjäytyvät sinisiksi ja tumat punaisiksi. Yleisin artefakta tässä värjäyksessä on sinisten rakeiden ilmeneminen, joka johtuu usein vanhentuneesta kaliumferrosyanidista tai rautakontaminaatiosta, esimerkiksi välineistä tai ruosteesta vedessä. Lisäksi värjäyksen herkkyyttä arvioidessa on huomioitava värjäysolosuhteet kuten pH, lämpötila ja värjäysaika. Matala rautapitoisuus ilmenee haaleana värjäyksenä, jota voi yrittää korjata pidentämällä värjäysaikaa. (Bancroft – Cook 1994: 208; Horobin – Bancroft 1998: 161–163; Suvana ym. 2013: 241–242.)

Berliininsini-värjäyksessä on tärkeää olla käyttämättä metallisia työvälineitä, sillä värjäys on herkkä epäpuhtauksille. Suoritamme virhelähteenä värjäyksessä rautakontaminaation, metallisia pinsettejä käyttäen. Lisäksi käytämme vanhentunutta rautaliuosta, joka on yli neljä kuukautta vanhaa. Oikean värjäysprotokollan mukaan rautaliuos on käyttökelpoinen vain yhden värjäyksen ajan, jonka jälkeen se on hävitettävä. Jokaista virhelähdettä suorittaessamme pidämme kontrollikudosleikkeen aina mukana, jotta näimme miten virhelähde vaikuttaa kontrolliin. (Eberhardt – Salo 2015.)

### 5.3 Elastiset säikeet–värjäys

Elastisilla säikeillä on amorfisia, säikeisiä ja sekoittuneita muotoja. Niitä löytyy ympäri elimistöä kaikkialta, mutta erityisesti ne liittyvät hengitys- ja verenkiertojärjestelmään sekä ihoon. Elastiset säikeet koostuvat kahdesta erillisestä komponentista. Ensimmäinen on amorfinen aine, joka biokemiallisesti vastaa elastiiniproteiinia. Toinen komponentti, joka ilmenee 4–13 nm jaksotuksissa, on elastisten säikeiden mikrosäikeinen proteiini. Nämä kaksi komponenttia yhdessä muodostavat sidekudoksille vetolujuutta ja

joustavuutta, ja mahdollistavat palautumisen venytyksen jälkeen. (Suvarna ym. 2013: 191.)

Elastisia säikeitä voidaan ilmentää monilla eri tekniikoilla, mutta vain osa niistä on nykyään enää käytössä. Yleisimmät elastisten säikeiden värjäysmenetelmät ovat Verhoeff-, Orseiini-, Weigertin resorcin-fuchsin- ja aldehydi-fuchsin-tekniikka. Käytämme opinnäytetyössämme elastisten säikeiden värjäykseen Verhoeff-tekniikkaa. Verhoeff-tekniikka on klassinen tapa värjätä elastisia säikeitä perinteisen fiksaation jälkeen. Karkeat säikeet värjäytyvät vahvasti, mutta hienorakenteisemmat säikeet haaleammin. Eri vaiheiden tarkka suorittaminen on tärkeää myös tässä värjäyksessä, jotta saavutetaan toistettavat tulokset. (Suvarna ym. 2013: 205–206.)

Verhoeff-värjäysliuos koostuu rauta-hematoksyliini- komponenteista, jotka sitoutuvat spesifisesti elastisiin säikeisiin. Värjäys perustuu kahteen eri vaiheeseen: ylivärjäykseen ja differentaatioon. Ferrikloridilla ja jodilla peitataan hematoksyliini elastiseen kudokseen. Ne hapettavat myös hematoksyliinin hemateiiniksi. Hematoksyliinin ja kudoksen väliin muodostuu myös vetysidos, sillä värimolekyyli on vedyn luovuttaja ja kudoksen vedyn vastaanottaja. Elastisella kudoksella on vahva kyky sitoa rauta-hematoksyliini-kompleksia, ja se sitookin paremmin ja kauemmin väriainetta itseensä kuin ympäröivät kudokset. Differentaatioissa ferrikloridi poistaa väri-sidosainekompleksin. Natriumtiosulfaattia taas käytetään värjäyksessä poistamaan jodiyhdistämää kudoksesta ja van Gieson-väriä käytetään tuomaan kontrastia hematoksyliinin kanssa, sillä van Gieson värjää kollageenin. Lopputuloksena Verhoeff-värjäysliuos värjää elastiset säikeet ja solujen nukleidit mustaksi, kollageeni sekä lihaskudos värjäytyvät punaisiksi ja sytoplasma sekä muut kudokskomponentit keltaisiksi van Giesonin avulla. (Parry 2014; Verhoeff-Van Gieson (VVG) Staining Protocol for Elastic Fibres. 2011.)

#### 5.4 Gram-värjäys ja sen virhelähteet

Gram-värjäys on jo kauan käytössä ollut värjäysmenetelmä, jolla pystytään erottamaan näytteestä grampositiiviset ja -negatiiviset bakteerisolut. Gram-värjäyksen alkuosan kehitti tanskalainen Hans Gram vuonna 1884. Myöhemmin saksalainen patologi Carl Weigert viimeisteli värjäyksen lisäämällä gram-värjäyksen loppuosaan safraniinikäsittelyn. Gram-värjäys on pysynyt vuosikymmenien läpi yhtenä tärkeimpänä ja yleisimpänä kliinisen bakteriologian värjäysmenetelmänä. (Duodecim. 2015; Meurman 2010.)

Gram-värjäys ilmentää näytteessä olevat grampositiiviset tai -negatiiviset bakteerisolut niiden soluseinän rakenteen perusteella. Ennen värjäyksen aloittamista on tärkeää muistaa kiinnittää näyte objektilasille joko kuumentamalla sitä tai fiksoimalla se 95-prosenttisessä alkoholissa noin 20–30 minuuttia. Värjäyksessä käytetty emäksinen kristallivioletti tunkeutuu bakteerisolujen sisään ja värjää ne sinivioleteiksi. Seuraavassa vaiheessa jodi-kaliumjodidiliuos kiinnittää värin bakteerisoluihin. Kyseisessä reaktiossa jodi ja kristallivioletti muodostavat suurehkon kompleksin. Sen jälkeen näyte huuhdellaan asetoni-alkoholiliuoksessa. Käsittelyssä grampositiivisten bakteerien paksuissa soluseinissä sijaitsevat useat peptidoglykaanirakenteet kutistuvat, minkä seurauksena kristallivioletti-jodikompleksit eivät pääse huuhtoutumaan soluista ulos, ja tuloksena nämä bakteerit värjäytyvät sinivioleteiksi. Gramnegatiivisten bakteerien soluseinän rakenteet ovat paljon ohuempia, eli niissä on vähemmän peptidoglykaanirakenteita kuin grampositiivisten bakteerien soluseinässä. Lisäksi alkoholikäsittely hajottaa niiden soluseinää liuottamalla siitä lipidejä. Tämän seurauksena kristallivioletti-jodikompleksit pääsevät bakteerin soluseinän läpi ulos solusta. Gramnegatiiviset solut saadaan kuitenkin näkyviin saksalaisen Weigertin kehittämän safraniinikäsittelyn avulla. (Bancroft – Cook 1994: 241; Duodecim. 2015.)

Gram-värjäyksessä virhelähteitä on kolme. Ensimmäinen on vanhentunut kristalliviolettiliuos, joka tuottaa värjäyksessä sinisen värin. Toisena meillä on myös vanhentunut jodiliuos. Gram-värjäyksessä on monia pesuja, jotka toteutetaan nopeina huuhteluina. Kolmantena virhelähteenämme ovat siis pitkät pesut aquassa, sekä juoksevassa vedessä. (Eberhardt – Salo 2015.)

## 5.5 Hematologinen giemsa-värjäys ja sen virhelähteet

Giemsa-värjäyksen kehitti vuonna 1867 syntynyt kemisti Gustav Giemsa. Värjäysmenetelmä kehitettiin ensisijaisesti mikrobiologialle malariaparasitiittien tunnistamiseen. Sitä alettiin hyödyntää myös patologiassa, kun sen huomattiin värjäävän korkealaatuisesti kromatiinia ja tumakalvoja sekä tuovan esiin solukomponenttien metakromasiaa ja näin paljastavan esimerkiksi syöttösolujen sytoplasman granulat. Patologiassa giemsa-värjäystä käytetään lähinnä hematopatologiassa hematopoeettisten kudosten ja verisivelyjen värjäämisessä ja joskus myös histopatologiassa helicobacter pylorin tunnistamisessa gastroskooppisista biopsioista. Hematologisella giemsa-värjäyksellä pystytään tunnistamaan hematopoeettisten kudosten erilaisia solulinjoja. Hematopoeettisia kudoksia ovat esimerkiksi perna, luuydin ja veri. Näissä kudoksissa kehitty-



vät veren puna- ja valkosolut. Hematologista giemsa-värjäystä käytetäänkin erilaisten kasvainten ja verisairauksien, kuten leukemioiden ja lymfoomien diagnostiikassa. (Barcia 2007: 292–294; Guide to Special Stains 2012: 31.)

Giemsa kehitti ”salaisen” metyleenisinen hapettimen, jonka hän nimesi Azure I:ksi. Azure I on yhdistelmä Azure A:ta ja Azure B:tä, jotka ovat molemmat variaatioita metyleenisinestä. Myöhemmin Giemsa yhdisti Azure I:n eosiin kanssa ja yhdisti nämä vielä metyleenisineen. Giemsa-värjäysmenetelmän periaate perustuukin basofiilisen väriaineen yhdistämiseen asidofiiliseen tai eosinofiiliseen väriaineeseen, jolla luodaan ”neutraali” väriaine. Tämä tekee giemsa-värjäyksestä polykromaattisen värjäyksen, eli se värjää usealla eri värillä. (Barcia 2007: 293; Guide to Special Stains 2012: 32.)

Giemsa-värjäyksen avainkohta on värjäyksen differentivaihe. Differentointi korostaa niitä värejä, joilla eri solutyypit värjäytyvät. Tämä mahdollistaa sen, että patologi tunnistaa eri solutyypit ja niiden kehitysvaiheet. Giemsa-värjäys on regressiivinen värjäys, eli näyte ensin ylivärjätään ja tämän jälkeen huuhdellaan, eli differentoidaan, jotta saataisiin haluttu värjäysintensiteetti. Huuhtelu tapahtuu differentointiliuoksessa, joka on joko hapan tai emäs väriaineesta riippuen. Giemsa-värjäyksessä differentointiliuoksina käytetään 96 %:sta etanolia ja laimennettua etikkahappoa. (HUSLABin käsivärjäysten työohjeet. 2014.)

Virhelähteenämme on differentoida näytteet väärin valmistetuissa differentointiliuoksissa. Differentointiliuoksista laimea etikkahappoliuos valmistetaan normaalisti lisäämällä 3–4 tippaa etikkahappoa 100 millilitraan aquaa. Liian vahvassa etikkahappoliuoksessa on lisätty yksi millilitra etikkahappoa 100 millilitraan aquaa ja liian laimeassa liuoksessa etikkahappoa on lisätty vain yksi tippa. Differentivaiheessa käytetään myös normaalin protokollan mukaan 96-prosenttista etanolia. Virhelähteenä olemme korvanneet tämän absoluuttisella etanolilla. Väriliuoksena käytetty Giemsa-liuos valmistetaan normaalisti 10-prosentin vahvuiseksi. Virhelähteenämme on käyttää liian vahvaa, 50-prosenttista giemsa-liuosta. (Eberhardt – Salo 2015.)

## 5.6 Masson-Fontana-värjäys ja sen virhelähteet

Melaniinit ovat joukko pigmenttejä, joiden väri vaihtelee vaaleanruskeasta mustaan. Tätä pigmenttiä löydetään useimmiten ihosta, silmästä ja aivojen mustatumakkeista. Melaniinit ovat sitoutuneita proteiineihin ja nämä kompleksit sijaitsevat solujen sy-

toplasmassa. Näitä soluja kutsutaan melaniinigranuloiksi. Melaniini pystyy pelkistämään hopeaa, jonka vuoksi sen ilmentämiseen käytetään usein hopeavärjäksiä. (Bancroft – Gamble 2008: 240–241.)

Hopeavärjäksiä on hyödynnetty histologiassa jo 1900-luvun alkupuolelta saakka. Hopeavärjäksiä voidaan hyödyntää laajasti, melaniinin lisäksi muun muassa neuroendokriinisen järjestelmän ja retikuliinisäikeiden tutkimisessa. Hopeavärjyksissä kudokset kyllästetään ensin hopean suolalla eli hopeanitraatilla. Hopeanitraatti tunkeutuu kudoksen eri osiin ja tietyt kudoksen osat, kuten hermot ja tyvikalvot, päästävät tiiviytensä vuoksi hopeanitraattia huonosti ulos. Hopeanitraatti pelkistetään kyllästämisen jälkeen metalliseksi hopeaksi, jolloin myös kudoksen osien sisään jäänyt hopeanitraatti pelkistyy. (Naukkarinen 2000: 155.)

Hopeavärjäksiä on kolmenlaisia ja näistä yksi on argentaffiininen värjäys. Argentaffiinissa värjyksissä kudoksessa oleva komponentti toimii hopean pelkistäjänä. Yksi tällainen värjäys on Masson-Fontana, jossa melaniini on hopean pelkistävä komponentti. Melaniini pystyy pelkistämällä vapauttamaan metallista hopeaa hopealiuoksesta, joka on ammoniakaalista. Metallinen hopea menettää sähköisen varauksensa ja sitoutuu melaniinigranuloissa sijaitseviin melaniini-proteiinikomplekseihin. Ammoniakaalinen hopealiuos värjää melaniinin mustaksi, jonka avulla melaniinin pystyy erottamaan mustana mikroskoopilla tarkasteltaessa. Masson-Fontana-värjäystä käytetään melaniinipigmentin osoittamisen lisäksi myös neuroendokriinisten kasvainten diagnostiikassa. (Naukkarinen 2000: 155; HUSLABin käsivärjäysten työohjeet. 2014.)

Masson-Fontana-värjyksessä käytetään aina positiivista kontrollia, jotta voidaan varmistaa värjäyksen onnistuminen. Värjyksessä käytetty hopeanitraattiliuos tulisi käyttöohjeiden mukaan säilyttää kylmässä ja valolta suojattuna. Tämän vuoksi kyseinen liuos valmistetaankin aina juuri ennen värjäyksen aloittamista ja käytetään vain kerran. Virhelähteenämme on käyttää yli neljä kuukautta vanhaa liuosta, joka on ollut huoneenlämmössä ja valoaltistettuna tämän ajan. (Eberhardt – Salo 2015.)

## 5.7 Unna-Pappenheim-värjäys ja sen virhelähteet

Metyylivihreä-pyroniini-värjäyksen julkaisi ensin Artur Pappenheim vuonna 1899 ja tätä menetelmää muokkasi myöhemmin 1902 Paul Unna. Unna-Pappenheim-värjäys osoittaa kudoksesta DNA:n ja RNA:n. (Bancroft – Gamble 2008: 226). Menetelmää käytetään

tään diagnostisessa patologiassa, kun halutaan tutkia lymfaattisia malignoomia (HUSLABin käsiväryäysten työohjeet. 2014).

Metyylivihreä on selektiivinen alkalinen väriaine nukleiinihapoille. Se on hydrofiilinen, kationinen väriaine, joka sisältää kuusi metyyli- ja yhden etyyli-substituentin. Siinä on epäpuhtautena metyyli-violettiä, joka täytyy pestä pois kloroformilla. Pyroniini on pieni, heikosti hydrofiilinen kationinen väriaine. Se sitoutuu ribosomien RNA:han normaalilla elektrostaattisella mekanismilla, esimerkiksi kationinen väriaine sitoutuu anioniseen nukleiinihappoon ja päinvastoin. Tiivistettynä, DNA värjäytyy puhdistetulla metyyli-vihreällä sini-vihreäksi ja pyroniini värjää solujen sytoplasmassa olevan RNA:n punaiseksi. Pyroniinin selektiivisyys RNA:ta kohtaan ei ole suuri, mutta tarkoin kontrolloiduissa olosuhteissa ja huolellisella differoinnilla pyroniinin käyttö tuottaa hyväksyttäviä tuloksia. Se on erityisen käytännöllinen runsaasti proteiineja syntetisoivien solujen, kuten plasmasolujen ja aktiivisten fibroblastien tunnistamiseen. (Bancroft – Cook 1994: 98; Horobin – Bancroft 1998: 118.)

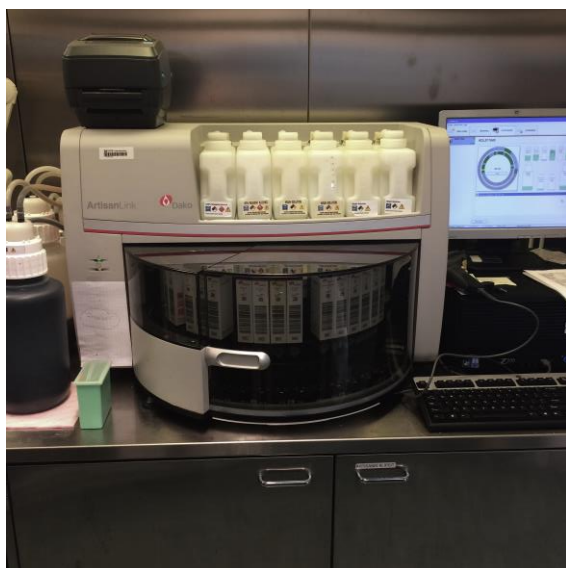
Väriliuoksen pH on kriittinen, kuten myös molempien väriaineiden konsentraatio. Myös viimeinen dehydraatiovaihe on tärkeä. Useimmissa menetelmissä värjäyksen jälkeistä vedellä huuhtomista vältetään. HUSLABin työohjeen mukaan virhelähteenä voi olla myös vetynyt butanoli ja lasin puutteellinen kuivaaminen värjäämisen aikana ja näin ollen leikkeeseen jäänyt kosteus. (Bancroft – Gamble 2008: 226; HUSLABin käsiväryäysten työohjeet. 2014.)

Unna-Pappenheim-värjäyksessä käytetään kaupallisista kantaliuoksista laboratorion valmistamaa väriliuosta, jota tulisi säilyttää jääkaapissa +4 °C:ssa valolta suojattuna. Liuos lämmitetään aina ennen värjäystä huoneenlämpöiseksi ja se säilyy kaksi kuukautta. Virhelähteenämme on käyttää yli neljä kuukautta vanhaa liuosta, jota on pidetty huoneenlämmössä valolle altistettuna. Oikean protokollan mukaan tehdyssä värjäyksessä dehydraatio tehdään kolmella kahden minuutin butanolikäsittelyllä. Virhelähteenämme oli pidentää butanolikäsittelyä kuudesta minuutista 12 ja 30 minuuttiin sekä kolmeen tuntiin. (Eberhardt – Salo 2015.)

## 5.8 ArtisanLink-värjäysautomaatti

Käsiväryäysten virhelähteiden lisäksi selvitämme koneellisesti suoritettavien elastiset säikeet- ja berlininsini-värjäyksen virhelähteet. HUSLABin Meilahden patologian labo-

ratoriossa nämä värjäykset suoritetaan Dakon valmistamalla ArtisanLink-värjäysautomaatilla. ArtisanLink-värjäysautomaattiin on ohjelmoitu valmiiksi eri värjäysohjelmat, eli laite toimii täysin automatisoidusti. Laitteeseen lisätään aina värjäysten välillä tarvittaessa pesuliuosta ja 96-prosenttinen ja absoluuttinen etanoli vaihdetaan päivittäin. Värjäysten reagenssipakkaukset lisätään värjäysautomaattiin aina tarvittaessa, eli niitä ei säilytetä koneessa.



Kuvio 5. ArtisanLink- värjäysautomaatti.

#### 5.8.1 Elastiset säikeet–värjäys ja sen virhelähteet

Elastisten säikeiden värjäyksille on Dakon omat kaupalliset värjäyspakkaukset. Värjäyspakkaus varmistaa optimoidun värjäyssuorituksen standardisoidulla ja validoidulla protokollalla. Värjäysprosessi on täysin automatisoitu, ja reagenssit annostellaan jokaiselle lasille yksi kerrallaan tarkasti säädellen. Värjäyksessä käytetään alkoholisoitua hematoksyliiniä, ferrikloridia ja Lugolin jodiliuosta, joka sisältää kaliumjodidia ja jodia. Van Gieson-liuos erottaa kollageenin elastiinista. ArtisanLink-värjäysautomaatinkin menetelmä perustuu ylivärjykseen ja differentointiin. Värjäysohjelmassa kudoksen ylivärjätään hematoksyliini-ferrikloridi-jodiliuoksella. Differentiaatiovaiheessa väri-sidosaineen muodostavat komponentit poistetaan ferrikloridin mukana. Elastisilla säikeillä on hyvä rauta-hematoksyliinin sitomiskyky, joten ne sitovat väriä pidempään kuin ympäröivät kudokset. (Dako. 2015; HUSLABin Artisan-värjäysten työohjeet. 2015.)

Virhelähteenämme elastisten säikeiden konevärjäykseen on laittaa tyhjä reagenssipakkaus värjäykseen. Tyhjänä pakkauksena käytimme Ferric Chloride 10 %- reagenssia, joka toimii elastisten säikeiden värjäyksessä toisena sidosaineena sekä hematoksyliinin hapettajana. Ferrikloridilla poistetaan myös värisidosainekomponentit. (Eberhardt – Salo 2015.)

### 5.8.2 Berliininsini-värjäys ja sen virhelähteet

Rautavärjäyspakkaus on samalla lailla kaupallinen ja värjäysprotokolla standardisoitu kuten edellä mainitussa elastisten säikeiden värjäysprotokollassakin. Rautavärjäyspakkaus sisältää kolme reagenssia; kaliumferrosyanidin, suolahappoliuoksen ja Nuclear fast red- liuoksen. Koneellisesti suoritettava rautavärjäys on hieman erilainen kuin perinteinen Perls:n menetelmä; tässä suolahappoliuos ja kaliumferrosyanidi yhdistetään vedessä. ArtisanLink-värjäysautomaatin värjäysmenetelmässä siis osoitetaan laimealla suolahappoliuoksella kudoksen proteiineista irrotetut ferri-ionit kaliumferrosyanidilla. Kuten käsivärjäysmenetelmässäkin, värjäysautomaatilla suorittaessa reaktiotuotteeksi muodostuu liukenematon ferriferrosyanidi eli berliininsini. (Dako 2015; HUSLABin Artisan-värjäysten työohjeet. 2015.)

Koneellisesti suoritettavan berliininsini-värjäyksen virhelähteenä on tyhjän reagenssipakkauksen käyttö värjäyksessä. Tyhjänä reagenssina käytämme Potassium Ferrocyanide 10 %- reagenssia. Tällä kaliumferrosyanidilla osoitetaan kudoksen proteiineista irrotetut ferri-ionit, eli reagenssi on tärkeä värjäyksen onnistumisen kannalta. (Eberhardt – Salo 2015.)

## 6 Työn toteutus

Tässä kappaleessa kerromme työhömmme sisältyvät työvaiheet. Käymme läpi myös käyttämämme välineet ja materiaalit.

### 6.1 Kudokset, niiden käsittely, valaminen ja leikkaaminen

Opinnäytetyössämme käsiteltäviin värjäyksiin valittiin kudokset värjäysten ja kudosten soveltuvuuden mukaan. Käyttämämme kudoksia olivat suoli, keuhko, maksa, iho ja

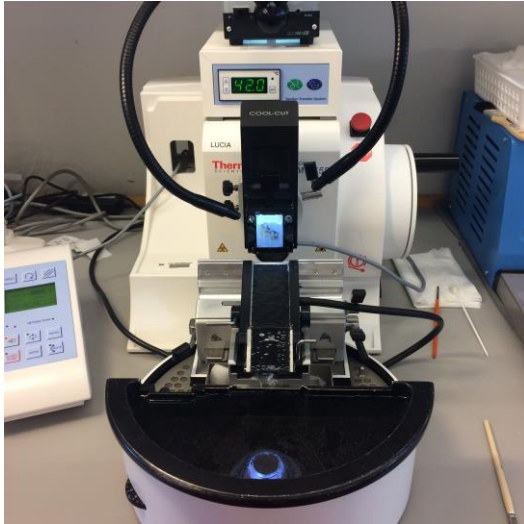
imusolmuke. Leikkasimme ylimääräisistä potilasnäytteistä sopivat kudospalat näytetekasetteihin. Kudosprosessointi tehtiin Leica ASP300/300S- kudosprosessorilla (kuvio 6).



Kuvio 6. vas. Kudosprosessori oik. Valulaite.

Kudosprosessoinnin jälkeen seuraavana vaiheena oli kudospaltojen valaminen parafiiniin. Kudospaltoja valettiin Sakuran Tissue-Tek TEC- valulaitteella (kuvio 6). Valuvaiheessa on tärkeää saada kudos valettua samaan tasoon ja apuna on hyvä käyttää esimerkiksi pinsettejä ja kudostampparia, joilla kudoksen saa hyvin painettua muotin pohjaan tasaisesti. Tämä tehdään, jotta leikkuvaiheessa kudosta ei menisi leikatessa hukkaan ja kudospalto saataisiin kokonaan edustettuna näytelasille.

Leikkasimme kudospaltoja Thermo Scientific Microm HM35SS-vesiliukumikrotomilla (kuvio 7). Leikepaksuutena käytimme 2,5  $\mu\text{m}$  ja ihokudoksessa 3,0  $\mu\text{m}$ . Leikkasimme mikrotomilla jokaista yksittäistä värjäystä varten tasalaatuiset ja saman paksuiset leikkeet. Vesiliukumikrotomissa on lämpövesiastia, jossa leikatut palto suoristuvat lämmön vaikutuksesta. Ideaali veden lämpötila on +42 °C:ta. Liian kuumassa vedessä parafiini sulaa kudospalteen ympäriltä ja hankaloittaa näytteen saamista lasille. Lämpöhauteesta näyteleikkeet nostetaan siveltimen avulla lasille, laitetaan kuivumaan ja kuivumisen jälkeen siirretään lämpölevylle.



Kuvio 7. Vesiliukumikrotomi.

## 6.2 Parafiinin poisto ja näytelasien peittely

Ennen käsivärjyksien aloittamista näytelaseilta on poistettava parafiini. Meilahden keskuspatologian laboratoriossa parafiinin poisto suoritetaan Sakuran Tissue-Tek DRS- automaatilla (kuvio 8), jota käytetään myös histologisissa konevärjäyksissä. Parafiini poistetaan laseilta laitteen laskeva-ohjelmalla, jossa lasit käyvät läpi laskevan alkoholisarjan. Tämän jälkeen näytelasit ovat valmiita värjykseen. Artisan-värjäysautomaatilla värjättäviä laseja ei tarvitse viedä Tissue-Tek DRS- automaattiin parafiinin poistoon, koska Artisan-laitteessa on ohjelmoitu oma parafiinin poisto ennen värjäysohjelman suorittamista.

Kun olimme saaneet värjykset suoritettua, lasit oli vielä peiteltävä. Lasit käytetään vielä värjyksen jälkeen absoluuttisessa etanolissa ja ksyleenissä, jotta ylimääräinen vesi saadaan poistettua ja näyte kirkastettua. Näytelasien päälle laitetaan peittelyfilmiä, jossa on hartsia. Peittelyfilmi kiinnitetään lasin pintaan ksyleenin avulla, joka liuottaa hartsia ja näin liimautuu lasin pintaan. Peittely tapahtuu Sakuran Tissue-Tek Film- peittelyautomaatilla (kuvio 8).



Kuvio 8. vas. Värejäysautomaatti, jolla suoritimme parafiininpoiston laskevalla alkoholisarjalla oik. Tissue-Tek- Film- peittelyautomaatti.

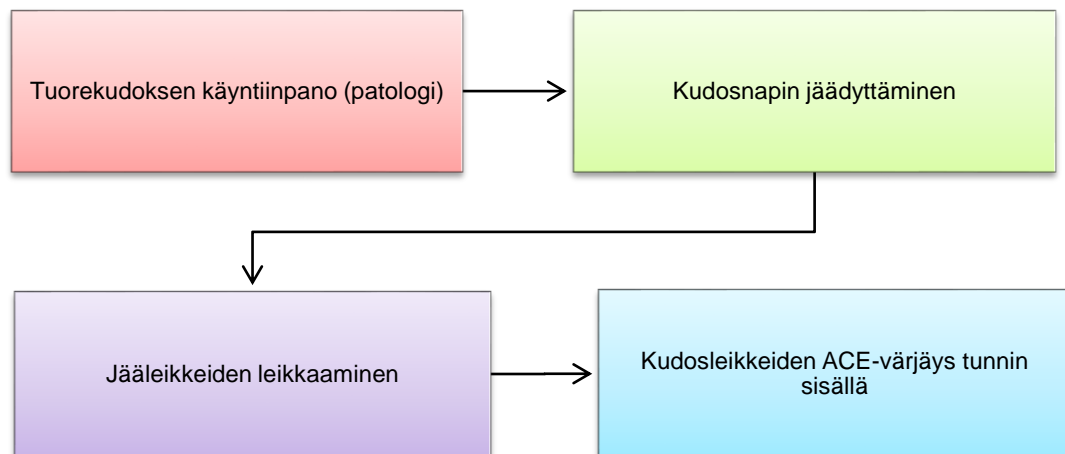
### 6.3 Kemikaalit

Meilahden patologian keskuslaboratorio tilaa tarvittavat kemikaalit, kuten käyttöliuokset ja reagenssit HUS:n ylläpitämältä liuoslaboratoriolta tai kaupallisilta yrityksiltä. Käyttämämme kemikaalit ovat lueteltuna liitteessä 1, ja värjäyksissä käyttämämme kanta- ja käyttöliuokset ovat lueteltuna liitteessä 2.

### 6.4 Jääleikkeen valmistus

Asetylokolinesteraasi-värejäystä varten leikkasimme meille valmiiksi valitusta tuorenäytteestä jääleikkeitä. Tuore suolikudos oli jäädytetty meille valmiiksi kudospapiksi nestemäisen typen avulla ja aseteltu siihen siten, että suoli näkyy poikkileikkauksena. Tarkoituksemme oli leikata näytelaseja vanhentumaan, jotta näemme mitkä ovat vaikutukset vanhentuneiden lasien värjäyksellä. Leikkasimme jääleikkeet Leica CM30505-kryostaatilla (kuvio 10). Leikepaksuutena käytimme 8  $\mu\text{m}$ . Leikkasimme viiden viikon sekä viikon vanhat lasit asetetystä värejäystä varten. Lisäksi leikkasimme kaksi tuntia ennen värjäystä lasin, jotta näemme sen eron oikean protokollan (liite 3) mukaan suoritettuun värjäykseen, jossa värjäys aloitetaan tunnin kuluessa. Kuviossa 9 on kuvattu jääleikeprosessin eteneminen.





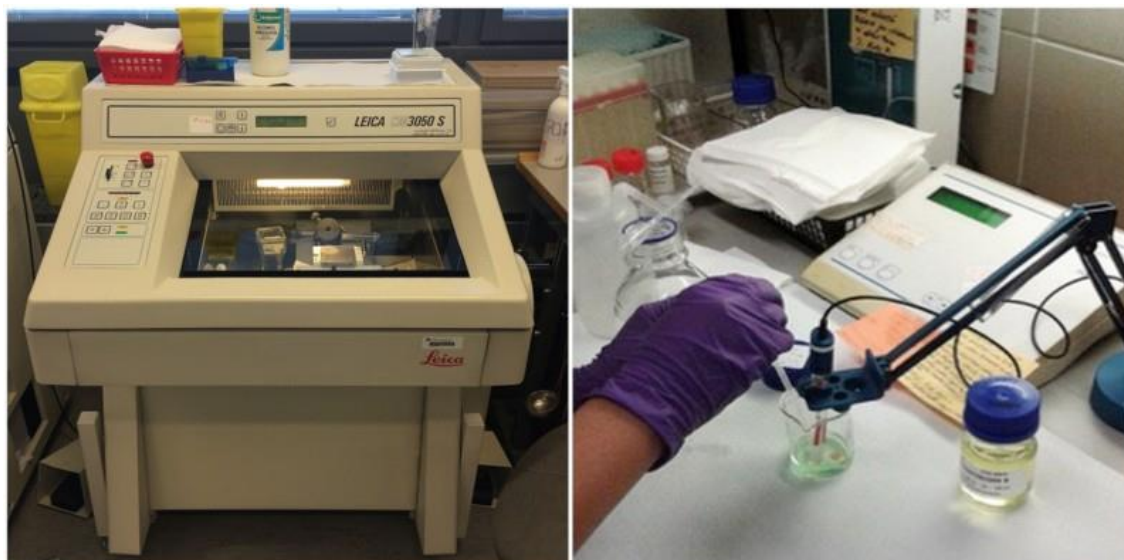
Kuvio 9. Jääleikeprosessin eteneminen.

## 6.5 Histologisten osoitusvärjäysten suoritus

Valitsimme opinnäytetyöhömmme kuusi käsin tehtävää osoitusvärjäystä sekä kaksi koneellista osoitusvärjäystä. Tässä kappaleessa esittelemme näiden osoitusvärjäysten suorituksen.

### 6.5.1 Asetytkolinesteraasi-värjäyksen suoritus

Asetytkolinesteraasi-värjäys suoritettiin käsivärjäyksenä HUSLAB:ssa käytettävän protokollan mukaisesti (liite 3). Inkubaatio- ja ACE-liuos tilataan liuoslaboratoriosta valmiina. Värjäyksen onnistumiselle erittäin tärkeää on saada väriliuos oikeaan pH-arvoon. Oikean pH:n mittaamiseen käytettiin MeterLab:n pHM210- mittaria (kuvio 10). PH nostettiin oikeaan arvoon, pH 6, natriumasetaatin avulla, joka myös tilataan valmiina HUS:n liuoslaboratoriosta. Värjäysprotokollan jälkeen näytelasit peiteltiin Tissue-Tek Film-peittely-automaatilla.



Kuvio 10. vas. Kryostaatti oik. pH- mittauksen suoritus ACE- värjäyksessä.

#### 6.5.2 Berliininsini-värjäyksen suoritus

Berliininsini-värjäys suoritettiin käsivärjäyksenä sekä koneellisesti ArtisanLink-värjäysautomaatilla. Käsivärjäyksenä berliininsini-värjäys suoritettiin HUSLABissa käytettävän protokollan mukaisesti (liite 4). Värjäyksessä käytettävä rautaliuos valmistetaan yhdistämällä yhtä suuret määrät 20 % väkevää suolahappoa ja 10-prosenttista kaliumferrosyanidia. Valmistettu liuos on käyttökelpoista ainoastaan yhden värjäyksen ajan. Värjäysprotokollan jälkeen lasit peiteltiin Tissue-Tek Film-peittelyautomaatilla.

ArtisanLink-värjäysautomaatilla suoritettava berliininsini-värjäys tehdään Iron-ohjelmalla (liite 5). Värjäyksessä käytettävät Dakon omat kaupalliset värjäyspakkaukset säilytetään huoneenlämmössä. Clearing Solution-reagenssi toimii ohjelmassa parafiinin poistossa. Kaikki reagenssit on sekoitettava hyvin ennen värjäysohjelman aloittamista. Lisäksi reagenssipakkauksista on poistettava mahdollinen ilma painamalla reagenssi-annostelijaa muutaman kerran, jotta varsinaisessa värjäyksessä reagenssi tulisi tasaisesti lasille. Värjäysohjelman loputtua laseja pidetään hetki absoluuttisessa etanolissa ja ksyleenissä, jonka jälkeen ne peitellään Tissue-Tek Film-peittelyautomaatilla.

### 6.5.3 Elastiset säikeet-värjäyksen suoritus

Elastiset säikeet-värjäys suoritetaan ArtisanLink-värjäysautomaatilla Elastic-ohjelmalla (liite 6). Värjäyksessä käytetään Dakon omia kaupallisia reagensseja, jotka säilytetään huoneenlämmössä. Kaikki reagenssit on sekoitettava hyvin ennen värjäysohjelman aloittamista. Lisäksi reagenssipakkauksista on poistettava mahdollinen ilma painamalla reagenssiannostelijaa muutaman kerran, jotta varsinaisessa värjäyksessä reagenssi tulisi tasaisesti lasille. Värjäysohjelman loputtua laseja pidetään hetki absoluuttisessa etanolissa ja ksyleenissä, jonka jälkeen ne peitellään Tissue-Tek Film-peittelyautomaatilla.

### 6.5.4 Gram-värjäyksen suoritus

Gram-värjäys suoritettiin käsivärjäyksenä HUSLABissa käytettävän protokollan mukaisesti (liite 8). Gram-värjäyksessä käytettävä Hucker-Conn kristallivioletti valmistetaan laboratorioissa itse kristallivioletista, 95-prosenttisesta etanolista, ammoniumoksalatista ja aquasta, jotka tilataan ulkopuolisilta valmistajilta. Liuksen valmistuksen jälkeen se on suodatettava. Kristallivioletti säilyy kaksi vuotta. Myös Lugolin jodi valmistetaan laboratorioissa ulkopuolisilta valmistajilta tilatuilla kaliumjodidilla, jodilla ja aqualla. Myös Lugolin jodin säilymisäika on kaksi vuotta. Kyseinen värjäys on monivaiheinen ja sisältää paljon nopeita huuhteluja juoksevassa vedessä ja aquassa. Pesut on tärkeä suorittaa nopeina, etteivät värjäyksessä käytettävät värit poistu kudoksesta liikaa. Värjäysprotokollan jälkeen lasit peiteltiin Tissue-Tek Film-peittelyautomaatilla.

### 6.5.5 Hematologisen giemsa-värjäyksen suoritus

Hematologinen giemsa-värjäys suoritettiin käsivärjäyksenä HUSLABissa käytettävän protokollan mukaisesti (liite 9). Värjäyksessä käytettävä giemsa-väriliuos laimennetaan 10 prosenttiseksi laboratorioissa 1:20 vahvuisella fosfaattipuskurilla kaupallisesta giemsa-väristä. Liuos on käytössä aina vain yhden päivän. Laimennettu etikkahappo laimennetaan laboratorioissa itse kaupallisesta etikkahaposta ja laimennoksen säilyvyys on viikko. Käytettävä 2-propanoli on tilattu ulkopuoliselta valmistajalta ja sen käyttöikä on noin kuukausi. Värjäysprotokollan jälkeen lasit peiteltiin Tissue-Tek Film-peittelyautomaatilla.

#### 6.5.6 Masson-Fontana-värjäyksen suoritus

Masson-Fontana-värjäys suoritettiin käsivärjäyksenä HUSLABissa käytettävän protokollan mukaisesti (liite 8). Värjäyksessä käytettävä hopeanitraattiliuos valmistetaan laboratorioissa tehdystä alkalisesta hopeanitraattiliuoksesta ja se on suodatettava ennen käyttöä. Hopeanitraattiliuosta käytetään vain yhden värjäyksen ajan, jonka jälkeen se hävitetään. Myös värjäyksessä käytettävät 0,2-prosenttinen kultakloridi ja 5-prosenttinen natriumtiosulfaatti valmistetaan laboratorioissa. HUS:n liuoslaboratorio valmistaa 0,1-prosenttisen Kernechtrot-väriliuoksen, joka tulee suodattaa ennen käyttöä. Värjäysprotokollan jälkeen lasit peiteltiin Tissue-Tek Film- peittelyautomaatilla.

#### 6.5.7 Unna-Pappenheim-värjäyksen suoritus

Unna-Pappenheim-värjäys suoritettiin käsivärjäyksenä HUSLABissa käytettävän protokollan mukaisesti (liite 10). Metyylivihreä-pyroniini-käyttöliuos valmistettiin kaupallisista liuoksista laboratorioissa ja se säilyy jääkaapissa valolta suojattuna kaksi kuukautta. Liuos lämmitetään ennen värjäystä huoneenlämpöiseksi. Myös dehydraatiovaiheessa käytettävät 1-butanolit ovat kaupallisia valmisteita. Värjäysprotokollan jälkeen lasit peiteltiin Tissue-Tek Film- peittelyautomaatilla.

#### 6.6 Leikkeiden mikroskopointi ja kuvaaminen

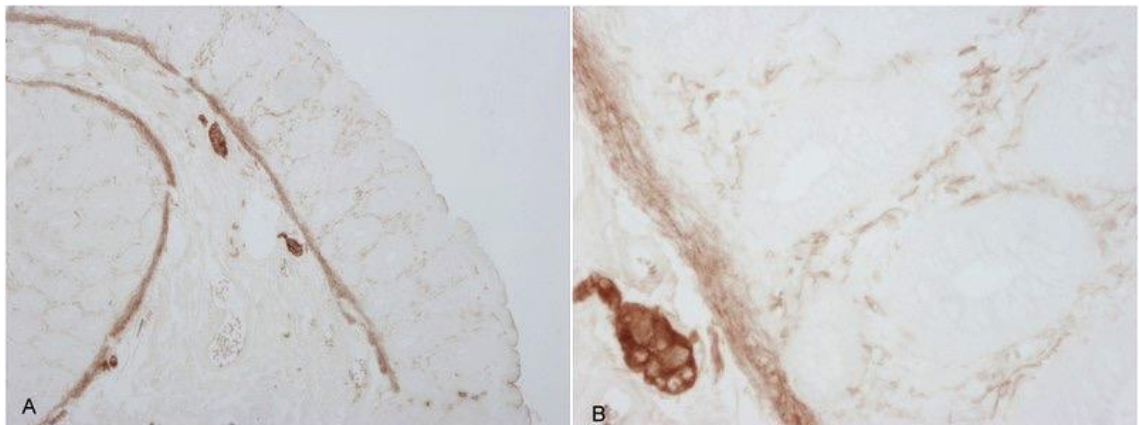
Värjäysten ja peittelyn jälkeen tarkastelimme jokaiset lasit mikroskoopin avulla ja etsimme leikkeistä edustavat kohdat valokuvausta varten. Leikkeet on kuvattu mikroskooppiin kiinnitetyllä kameralla ja valotus on säädetty kuvissa samaksi, jotta ne olisivat vertailukelpoisia. Asetylkolinesteraasi-värjäyksen näytelasit kävimme yhdessä läpi patologi Jouko Lohin kanssa, joka valitsi mielestään edustavimmat kuvauskohdat leikeiltä.

### 7 Tulokset

Tässä kappaleessa käymme läpi opetusmateriaaliimme liittyvien tutkimustehtävien tulokset. Kappaleessa kerromme edellä mainittujen virhelähteiden vaikutukset osoitusvärjäyksiin ja esittelemme opetusmateriaaliimme liitettävät havainnollistavat leikekuvat.

## 7.1 Asetytkolinesteraasi-värjäys

Asetytkolinesteraasi-värjäystä käytetään Hirschsprungin taudin diagnosoimiseen. Kudosena tässä värjäyksessä käytettiin tuoretta ja tervettä suolta. Mikäli potilaalla on kyseinen tauti, värjäytyssä leikkeessä on nähtävissä mukoosan alueelle työntyviä pieniä hermofibrillejä. Ne värjäytyvät asetlytkolinesteraasi-värjäyksessä positiivisina. Tällaisessa näytteessä ganglioita ei ole nähtävissä, koska ne puuttuvat kokonaan alueilta, joissa hermofibrillejä esiintyy. (HUSLABin käsivärjäysten työohjeet. 2014.) Kuviossa 11 on esitelty oikean protokollan mukaan suoritettu asetlytkolinesteraasi-värjäys suolikudoksessa. Kuviossa 11a voidaan erottaa suolen sisäpinnalla sijaitsevan mukoosan (oikeanpuolimmaisoin kerros) alla sijaitseva submukoosa, josta voidaan erottaa ruskeaksi värjäytyneitä ganglioita. Oppimateriaalissamme esitämme lukijalle aktivoivia kysymyksiä: Minkä värisiksi hermofibrillit ja gangliot värjäytyvät? Miltä alueelta näitä pitäisi löytää?

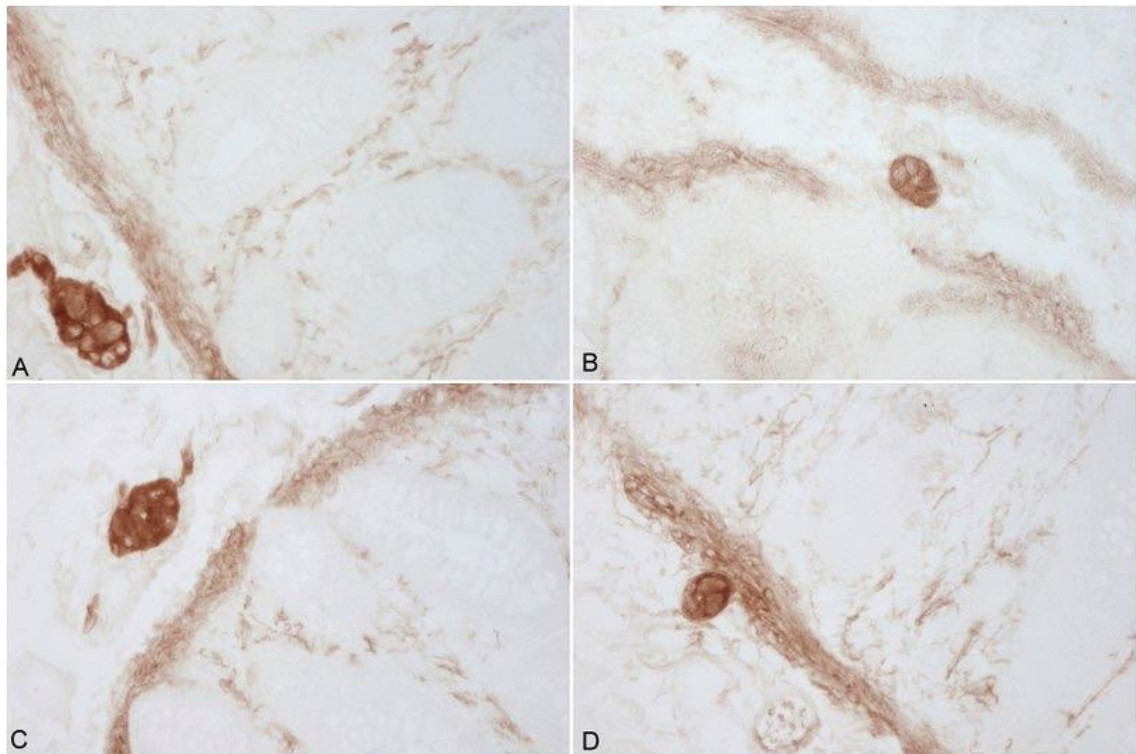


Kuvio 11. Asetytkolinesteraasi-värjäys suolikudoksessa A) 20x suurennos B) 40x suurennos.

Virhelähteinä tässä värjäyksessä ovat huoneenlämpöinen ACE-liuos, huoneenlämpöisen ACE-liuoksen ja vanhentetun inkubaatioliuos B:n yhdistelmäliuos sekä vanhat lasit. Näitä on yhteensä kolme eri lasia: viiden ja yhden viikon vanhat lasit sekä kaksi tuntia vanha lasi (Eberhardt – Salo 2015; Lohi 2015.)

Kuviossa 12 on esitelty asetlytkolinesteraasi-värjäyksen virhelähteet vanhojen lasien osalta. Vertauskohteeksi on kuvasarjaan laitettu myös normaalin protokollan mukaan suoritettu värjäys, jossa siis värjäys on aloitettu tunnin sisällä tuorenäytteen leikkaamisesta (kuvio 12a). Kuviossa 12b on värjättyinä viisi viikkoa vanha lasi, kuviossa 12c viikon vanha lasi ja kuviossa 12d kaksi tuntia vanha lasi. Vanhojen lasien värjäykset

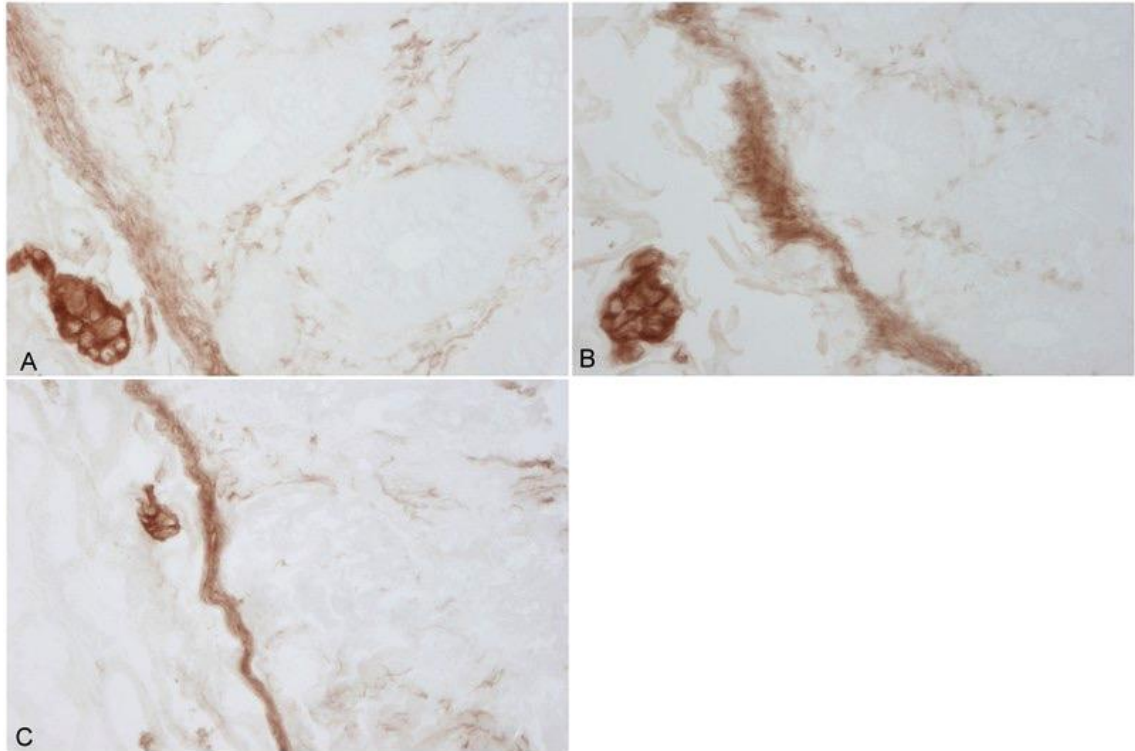
eivät poikenneet merkittävästi toisistaan tai normaalin protokollan mukaan tehdystä värjäyksestä. Ainut merkittävä huomio värjäyksen onnistumisessa on viiden viikon vanhassa lasissa, jossa gangliot näkyvät hieman sumeampina verrattuna oikean protokollan mukaan värjättyyn lasiin. Viikon vanhan lasin värjäyksessä (kuvio 12c) ei juuri näkynyt eroa normaalin protokollan mukaan värjättyyn lasiin. Näin ollen ei myöskään kahden tunnin vanhan lasin värjäyksessä näkynyt eroa normaaliin. Yleisesti vanhoista laseista voidaan sanoa, että värjäytyvyys on hieman heikompi vanhimmissa, eli viiden viikon vanhoissa laseissa, mutta ne ovat silti lähes hyvin tulkittavissa. (Lohi 2015.)



Kuvio 12. Asetyylkolinesteraasi-värjäyksen virhelähteet A) näyte värjättyä oikean protokollan mukaan B) 5 viikkoa vanha lasi C) 1 viikon vanha lasi d) 2 tuntia vanha lasi. 40x suurennokset.

Kuviossa 13 on esitelty lisää asetüylkolinesteraasi-värjäyksen virhelähteitä. Kuviossa 13a on vertailukohteeksi lisätty normaalin protokollan mukaan värjätty näyte. Kuviossa 13b värjäyksessä on käytetty vanhaa ja huoneenlämmössä säilytettyä asetüylkolinesteraasi-liuosta. Värjäys on onnistunut hyvin eikä se eroa värjäyksen kannalta lähes ollenkaan normaalin protokollan mukaan värjätystä näytteestä. Kuviossa 13c lasin värjäyksessä on käytetty vanhentunutta asetüylkolinesteraasi- sekä inkubaatioliuosta. Myös tämä värjäys on hyvin onnistunut, eikä artefaktoja ole havaittavissa.

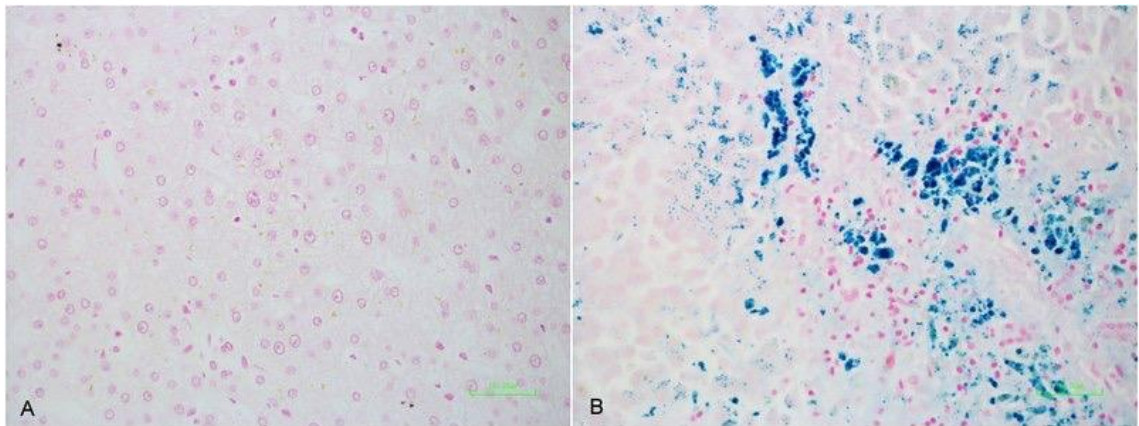




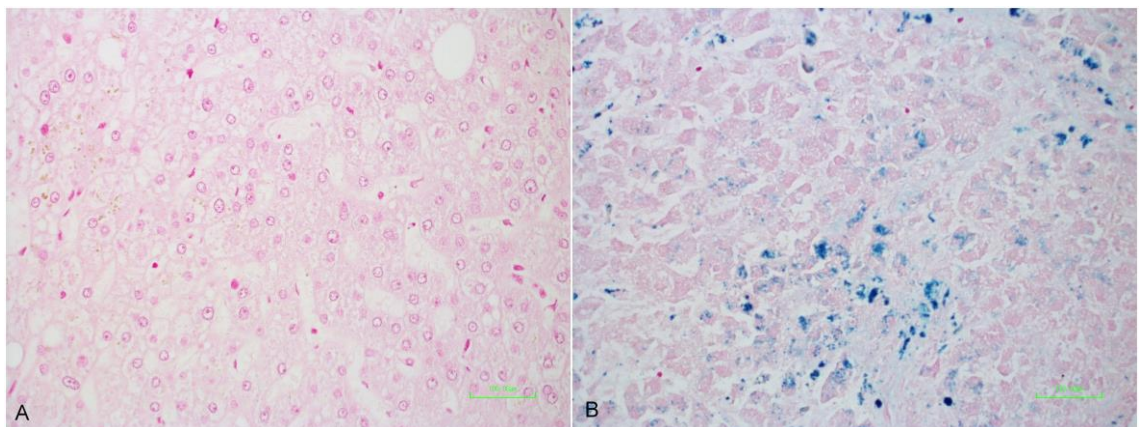
Kuvio 13. Asetyylkolinesteraasi-värjäyksen virhelähteet A) näyte värjättyinä oikean protokollan mukaan B) vanhennettu substraattiliuos (ACE- liuos) C) vanhennettu substraattiliuos (ACE- liuos) + vanhennettu inkubaatioliuos. 40x suurennokset.

## 7.2 Berliininsini-värjäys

Berliininsini-värjäyksellä ilmenetään rautaa kudoksesta. Värjäystä käytetään muun muassa luuydin-, maksa- ja ihonäytteissä. Sitä käytetään myös ruskeata pigmenttiä sisältävien solujen erotusdiagnostiikassa, kuten esimerkiksi raudan ja melaniinin erottamisessa. Värjäyksessä tumat näkyvät punaisen sävyinä ja rauta erottuu sinisinä jyväsinä. Käytimme berliininsini-värjäyksessä rautanegatiivista maksakudosta, jotta mahdollisten väärin positiivisten tulosten havaitseminen olisi mahdollista. (HUSLABin käsinvärjäysten työohjeet. 2014.) Kuviossa 14 on esitelty oikein suoritettua, käsin tehtyä berliininsini-värjäyksen tulokset maksakudoksessa ja kontrollikudoksessa. Kontrolli on myös maksakudosta. Kuviossa 15 on samoista kudoksista tehty berliininsini-värjäys ArtisanLink-värjäysautomaatilla. Kuvista nähdään kontrollikudoksessa olevan raudan värjäytyneen sähkönsiniseksi, jonka avulla voidaan varmistaa värjäyksen onnistuminen. Tumat ja muu kudos värjäytyvät punertaviksi. Oppimateriaalissamme esitämme värjäyksistä aktivoivia kysymyksiä lukijalle: Miten kudoksessa oleva rauta värjäytyy? Miten tumat värjäytyvät?



Kuvio 14. Berliininsini-värjäys käsin A) Maksakudos B) kontrollinäyte. 40x suurennokset.



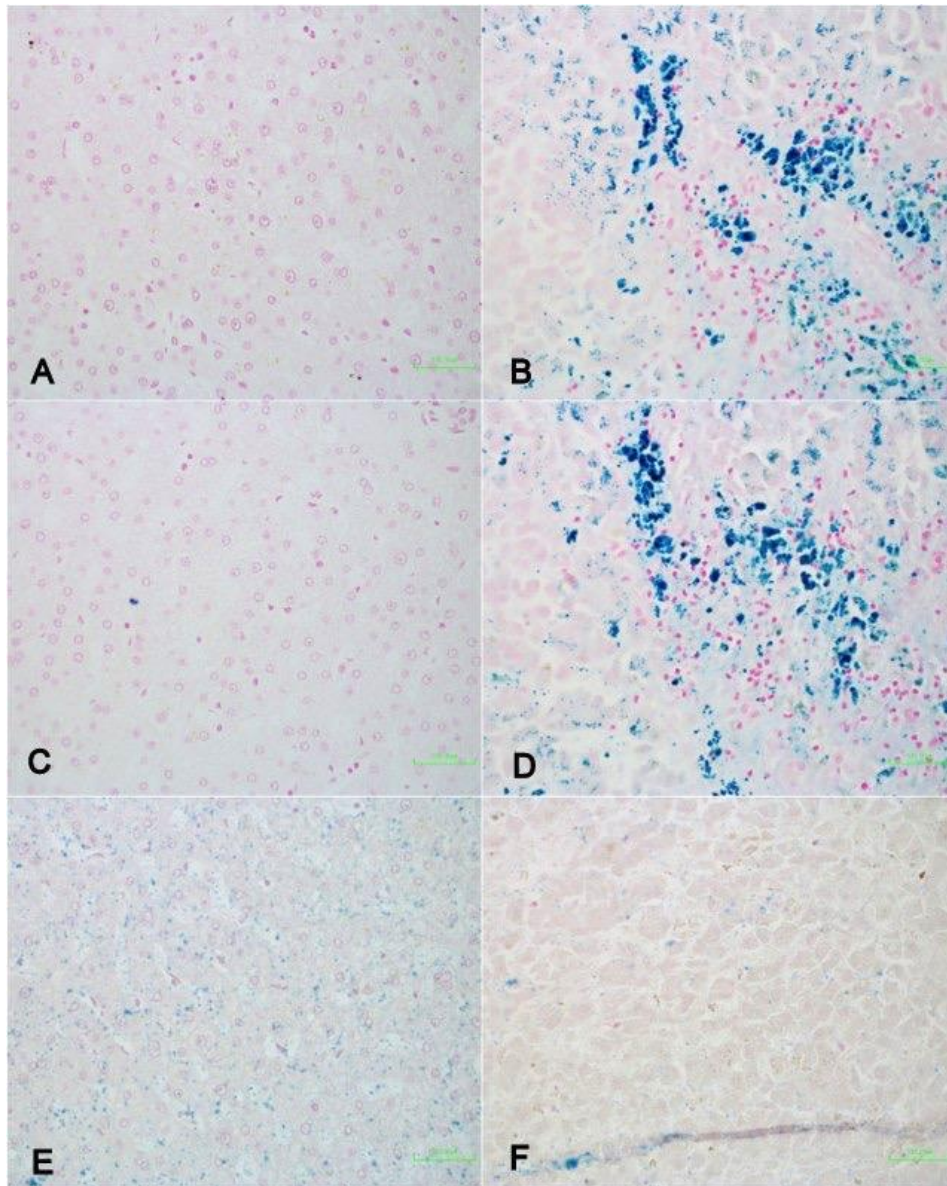
Kuvio 15. Berliininsini-värjäys ArtisanLink-automaatilla A) maksakudos B) kontrollinäyte. 40x suurennos.

Virhelähteinä käsivärjäyksissä ovat metallipinseteillä aiheutettu rautaliuoksen kontaminointi ja neljä kuukautta vanhentuneen rautaliuoksen käyttö. ArtisanLink-värjäysautomaatilla suoritetuissa värjäyksissä virhelähteenä on tyhjennetyin kaliumferrosyanidi-reagenssipakkauksen käyttäminen värjäyksessä. (Eberhardt – Salo 2015.)

Kuviossa 16 on esitelty berliininsini-värjäyksen virhelähteet maksakudoksessa. Kuvasarjassa on mukana myös normaalin protokollan mukaan suoritettu värjäys kudokselle sekä positiiviselle kontrollille (Kuvio 16a ja 16b). Kuviossa 16c on esitelty rautakontaminaation aikaan saama tulos kudokselle. Kudoksessa oli huomattavissa joitakin rautakontaminaation aikaan saamia rautajyväsiä. Kuviossa 16d on rautakontaminaatio värjäyksessä käytetty kontrolli, jonka värjäystulos oli lähes samanlainen kuin kuviossa 16b. Kuviossa 16e ja 16f maksakudoksen ja kontrollikudoksen värjäyksessä on käytet-

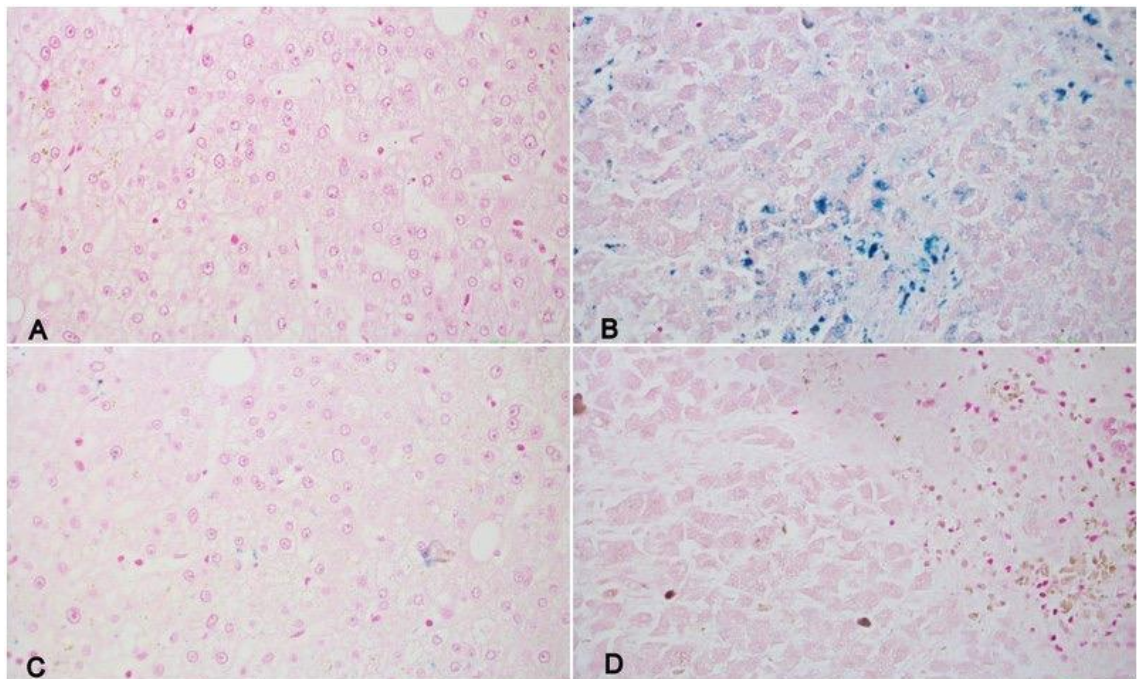


ty yli neljä kuukautta vanhaa rautaliuosta. Kontrollista (Kuvio 16f) voidaan huomata, kuinka normaalisti vahvasti positiivinen kontrolli jää erittäin haaleaksi, lähes negatiiviseksi vanhaa rautaliuosta käytettäessä. Varsinainen maksakudos (Kuvio 16e) on taas värjäytynyt kauttaaltaan sinertäväksi eli rautaposiitiviseksi, vaikka kudoksessa ei rautaa olekaan. Lisäksi punaisiksi värjäytyviä tumia ei pysty selkeästi erottamaan. Kuviossa 16e ja 16f voidaan siis nähdä vanhan rautaliuoksen käytön vaikutus, eli se antaa lähes väärän negatiivisen kontrollista, kun taas näytteestä tulee väärä positiivinen tulos.



Kuvio 16. Käsivärjätyn berliininsini-värjäyksen virhelähteet A) näyte värjätynä oikean protokollan mukaan B) kontrollinäyte värjätynä oikean protokollan mukaan C) näytteen värjäyksessä rautakontaminaatio metallipinseteillä D) kontrollinäyte rautakontaminaatio metallipinseteillä E) näytteen värjäys vanhennetulla käyttöliuoksella F) kontrollinäyte vanhennetulla käyttöliuoksella. 40x suurennokset.

Kuviossa 17 on esitelty ArtisanLink-värjäysautomaatilla suoritettu värjäys normaalin protokollan mukaan sekä koneellisen berliininsini-värjäyksen virhelähde. Kuviossa 17a on normaalin protokollan mukaan suorettu värjäys ja kuviossa 17b värjäyksessä käytetty kontrolli. Kontrollin rautajyväset värjäytyvät selkeästi sähkönsiniseksi. Kuviossa 13c kudoksen värjäyksessä on käytetty tyhjennettyä kaliumferrosyanidi-reagenssia. Kudos on värjäytynyt hieman haaleammaksi punertavaksi kuin normaalin protokollan mukaan värjätty kudos. Kuviossa 17d nähdään virhelähteen kontrolli, jonka pitäisi olla rautaposiitiivinen. Tyhjä kaliumferrosyanidi-reagenssi saa aikaan sen, että kontrollikudoksen proteiineista ei saada irrotettua ferri-ioneita, jolloin rautailmentymiä ei saada näkyviin värjäyksessä.

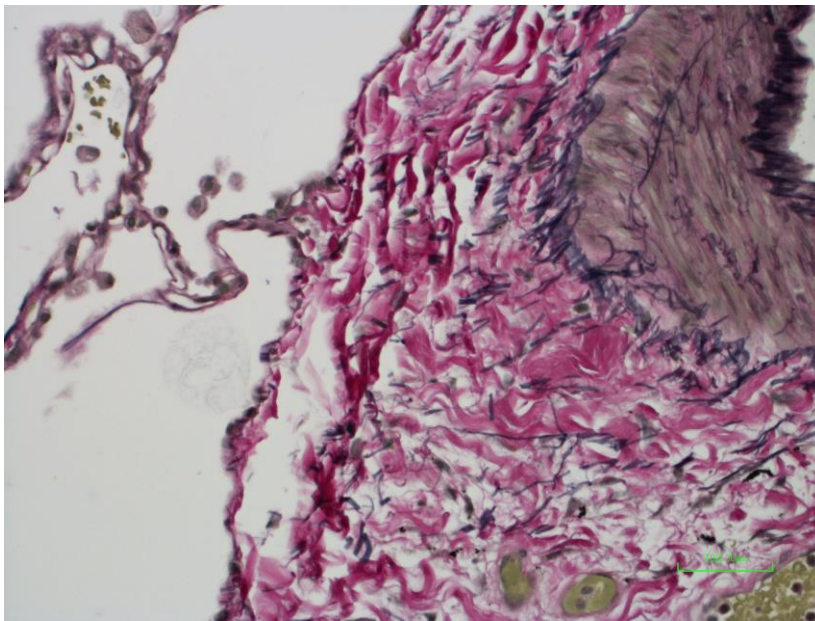


Kuvio 17. ArtisanLink-värjäysautomaatilla suoritettun berliininsini-värjäyksen virhelähteet A) Näyte värjättyä oikean protokollan mukaan B) kontrollinäyte värjättyä oikean protokollan mukaan C) näyte värjättyä tyhjennetyllä reagenssipakkauksella D) kontrollinäyte tyhjennetyllä reagenssipakkauksella. 40x suurennokset.

### 7.3 Elastiset säikeet-värjäys

Elastiset säikeet-värjäys on tarpeellinen muun muassa eräiden verisuonitautien yhteydessä. Näiden lisäksi elastisten säikeiden osoittaminen on tarpeen joissakin sydänlappien muutoksissa, elastolyttisissä ihoprosesseissa ja elastiinituumoreissa. Värjäyk-

sessä elastiset säikeet värjäytyvät mustiksi. Kollageeni ja lihaskudos näkyy punertavan sävyinä ja sytoplasma ja muut kudskomponentit keltaisina. (HUSLABin Artisan-värjäysten työohjeet. 2015; Verhoeff-Van Gieson (VVG) Staining Protocol for Elastic Fibres. 2011.) Kuviossa 18 nähdään elastiset säikeet-värjäys keuhkokudoksessa. Bronkiolien reuna-alueilla voidaan huomata elastisten säikeiden värjäytyneen lähes mustilla sävyillä. Kollageeni näkyy punertavana kuvassa. Oppimateriaaliin liitetään aktivoivia kysymyksiä värjäyksestä: Miten elastiset säikeet värjäytyvät? Miten muu kudos värjäytyy?

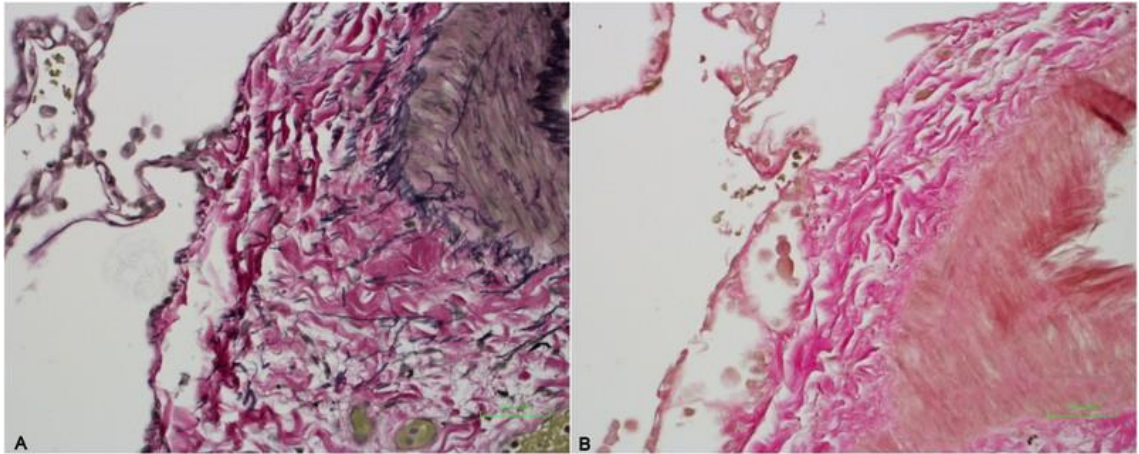


Kuvio 18. Elastiset säikeet-värjäys keuhkokudoksessa. 40x suurennos.

ArtisanLink-värjäysautomaatilla suoritettuna elastiset säikeet-värjäyksen virhelähde on tyhjennetyin ferrikloridi reagenssin käyttäminen (Eberhardt – Salo 2015).

Kuviossa 19 on esitelty elastiset säikeet-värjäyksen virhelähde verrattuna oikean protokollan mukaan värjättyyn keuhkokudokseen. Vasemmanpuoleisessa kuviossa 19a keuhkokudos on värjätty normaalin protokollan mukaan. Kuviossa 19b värjäyksessä on käytetty tyhjennettyä reagenssipakkausta. Tyhjän ferrikloridireagenssin käyttö tuottaa haalean, pelkästään punertavan tuloksen. Eli elastiset säikeet eivät värjäydy lainkaan tyhjää ferrikloridi reagenssia käytettäessä. Tämä johtunee siitä, että ferrikloridi toimii värjäyksenä peittausaineena hematoksyliinille. Kun ferrikloridia ei ole, hematoksyliini ei pääse tarttumaan kudokseen, jolloin elastiset säikeet eivät värjäydy.

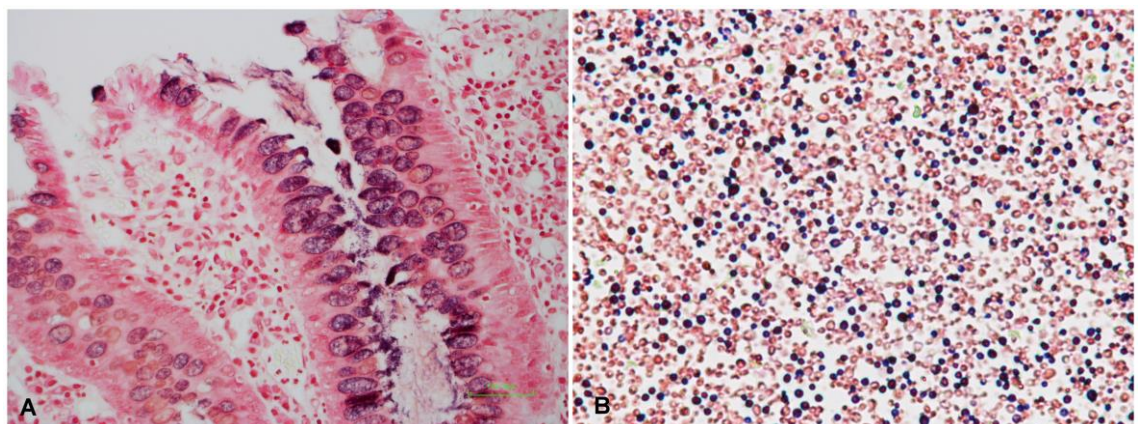




Kuvio 19. Elastiset säikeet-värjäyksen virhelähteet A) näyte värjättyä oikean protokollan mukaan B) näyte värjättyä tyhjennetyllä reagenssipakkauksella. 40x suurennokset.

#### 7.4 Gram-värjäys

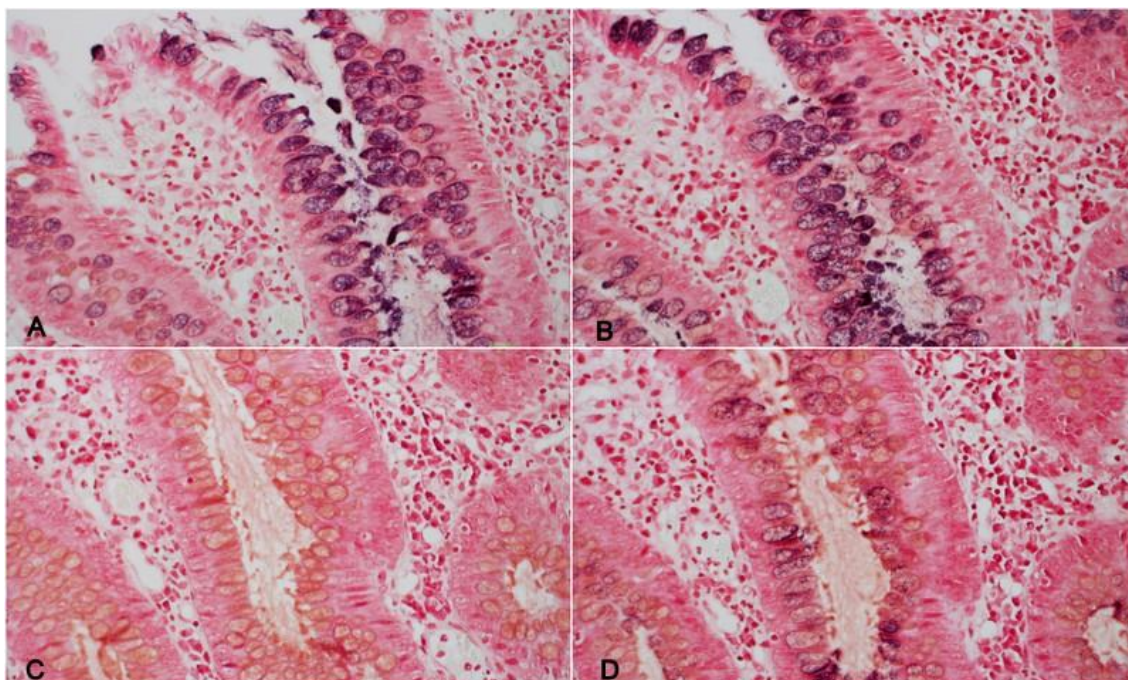
Gram-värjäyksellä bakteerit jaotellaan grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin bakteereihin. Grampositiiviset bakteerit värjäytyvät sinisen mustilla sävyillä ja gramnegatiiviset bakteerit punaisiksi. Myös tumat näkyvät punaisina. (HUSLABin käsinvärjäysten työohjeet. 2014.) Kuviossa 20 on esitelty oikein suoritetun gram-värjäyksen tulos suolikuudessa sekä kontrollikuudessa. Kuviossa 20a näkyy suolen mukoosa-alueita, jossa siniseksi värjättyneitä grampositiivisia bakteereita on nähtävillä limaa tuottavien pikarisolujen sisällä. Kuviossa 20b siniseksi grampositiiviset bakteerit näkyvät ympäriinsä kudosta. Oppimateriaalissamme gram-värjäyksestä annetaan lukijalle aktivoivia kysymyksiä: Miten grampositiiviset ja gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät? Miten tumat värjäytyvät? Minkä kokoisia bakteerit ovat?



Kuvio 20. A) Gram-värjäys suolikuudessa. B) kontrollikudos. 40x suurennos.

Virhelähteinä gram-värjäykselle ovat yli neljä kuukautta vanhentuneiden kristallivioletti- ja jodiliuosten käyttäminen sekä lisäksi värjäyksessä suoritettujen liian pitkät pesut aqualla ja juoksevalla vedellä (Eberhardt – Salo 2015).

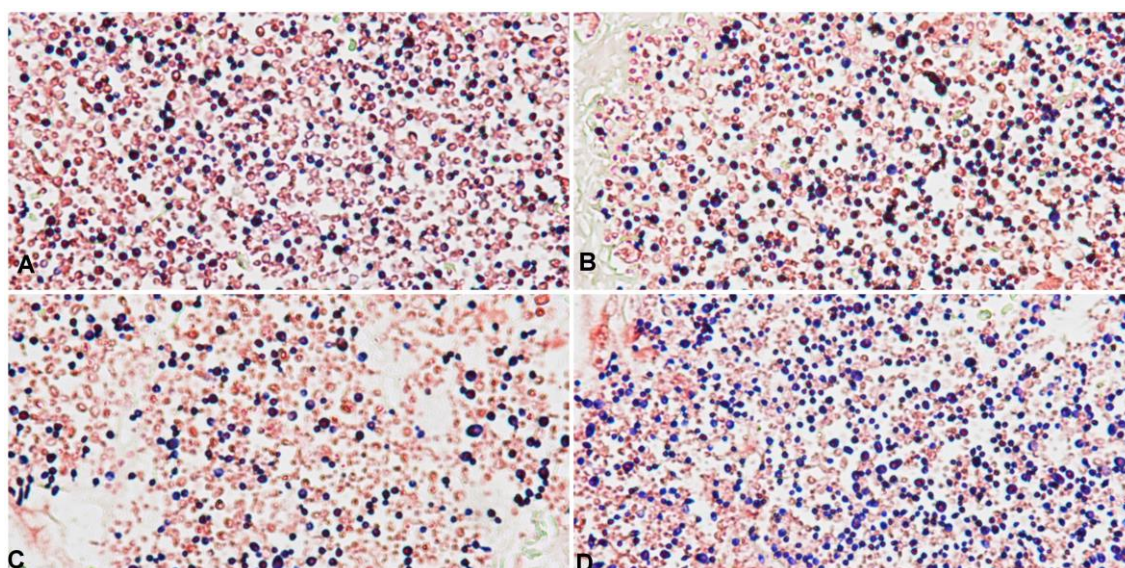
Kuviossa 21 on esitelty gram-värjäyksissä toteutetut virhelähteet sekä vertauskohteeksi normaalin värjäysprotokollan mukaan suoritettu gram-värjäys suolikudoksessa (kuvio 21a). Kuviossa 21b värjäyksessä on käytetty vanhentunutta kristallivioletti-liuosta. Väri-intensiteetti ei eroa huomattavasti normaalin protokollan mukaan värjäystä kudoksesta. Kristallivioletti on tarttunut lähes yhtä hyvin grampositiivisiin bakteereihin kuin kuviossa 21a. Kuviossa 21c värjäyksessä on käytetty vanhentunutta jodi-liuosta. Kuvasta voidaan huomata, että värjäystulos on haalean punertava, eivätkä grampositiiviset bakteerit ole värjäytyneet sinertäviksi. Kristallinvioletti- ja jodikompleksin muodostus ei siis tapahdu normaalisti, minkä seurauksena grampositiiviset bakteerit värjäytyvät virheellisesti. Kuviossa 21d värjäyksessä on suoritettu liian pitkät pesut. Tuloksena voidaan huomata, että liian pitkät pesut saavat aikaan haalean värjäystuloksen. Kudoksessa on huomattavissa hieman sinertäviä kohtia, mutta verrattaessa värjäytyvyyttä normaalin protokollan mukaan suoritettuun kudokseen on sinertävyys liian haalea.



Kuvio 21. Gram-värjäyksen virhelähteet A) Näyte värjättyä oikean protokollan mukaan B) näyte värjättyä vanhentunulla kristallivioletti- liuoksella C) näyte värjättyä vanhentunulla jodi-liuoksella D) näytteen värjäyksessä suoritettu liian pitkät pesut. 40x suurennokset.



Kuviossa 22 on esitelty toteutetut virhelähteet gram-värjäyksessä käytetyssä kontrollikudoksessa. Kuviossa 22a on verrokkina oikean protokollan mukaan värjätty kontrolli. Koska kontrollikudos on sisältää todella paljon grampositiivisia bakteereja, ovat ne värjättyneet melko kiitettävästi virhelähteistä huolimatta. Kuviossa 22c on värjäyksessä käytetty vanhennettua jodiliuosta. Varsinaisessa kudoksessa vanhentuneen liuoksen käyttäminen aiheutti gramnegatiivisten bakteerien värjäytymättömyyden. Kontrollikudoksen bakteerit ovat siitä huolimatta värjättyneet sinisiksi. Kuviossa 22d värjäyksessä on suoritettu liian pitkät pesut. Vaikka gramnegatiiviset bakteerit ovatkin värjättyneet siniksi, on niiden sävy selkeästi haaleamman sininen kuin oikean protokollan mukaan värjätyn kontrollikudoksen bakteerit. Saatujen tulosten perusteella kontrollikudosta tarkastelemalla voitaisi luulla värjäyksen onnistuneen, vaikka varsinaisessa näytekudoksessa gramnegatiiviset bakteerit eivät olekaan värjättyneet. Tämä voisi johtaa virheellisiin johtopäätöksiin ja mahdollisesti väärään diagnoosiin.

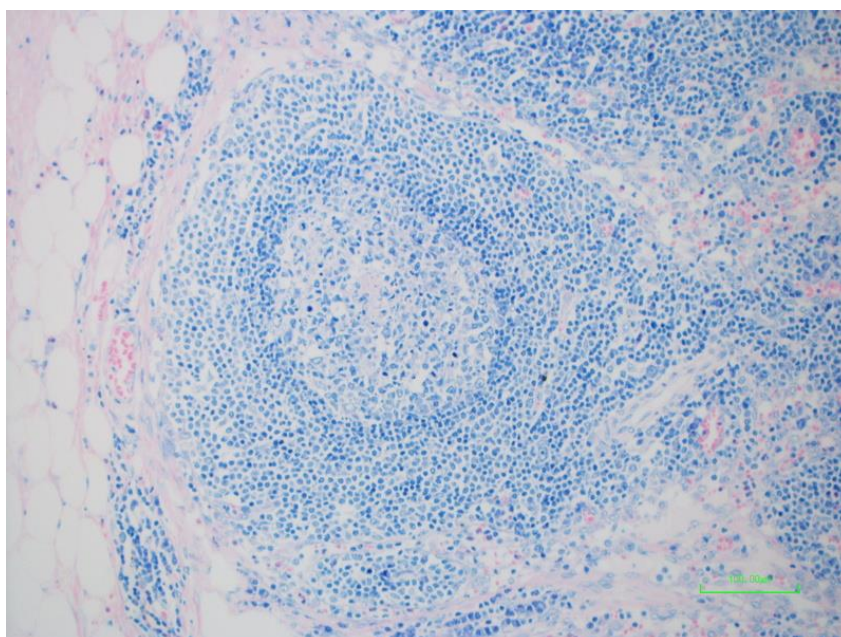


Kuvio 22. Gram-värjäyksen virhelähteet kontrollikudoksessa A) oikean protokollan mukaan värjätty näyte B) näyte värjätty vanhentuneella kristallivioletilla C) näyte värjätty vanhentuneella jodiliuoksella D) näytteen värjäyksessä suoritettu liian pitkät pesut. 40x suurennos.

## 7.5 Hematologinen giemsa-värjäys

Hematologisessa giemsa-värjäyksessä loiset ja monet mikro-organismit värjättyvät tumman sinisiksi ja tumat sinisiksi. Muut kudokset värjättyvät sinisen ja vaaleanpunaisen eri sävyillä. Giemsa-värjäystä käytetään sytologiassa solutyypin tunnistamiseen

ja mikro-organismien värjäämiseen, kun taas hematopatologiassa sitä käytetään leukemioiden, myeloomien ja lymfoomien diagnostiikassa eri solutyypin tunnistamiseen. (HUSLABin käsinvärjäysten työohjeet. 2014.) Kuviossa 23 on esitetty hematologisen giemsa-värjäyksen tulos imusolmukekudoksessa. Kuvassa nähdään lymfosyyttien värjäytyneen sinisellä ja muun kudoksen, kuten sidekudoksen ja punasolujen, värjäytyneen vaaleanpunaiseksi. Oppimateriaalissa kyseisestä värjäyksestä annetaan aktivoivia tehtäviä: Miten tumat värjäytyvät? Miten kudoksen eri osat värjäytyvät? Millaiset värisävyt ovat? Onko virhelähdekuvissa eroja värisävyjen suhteen?



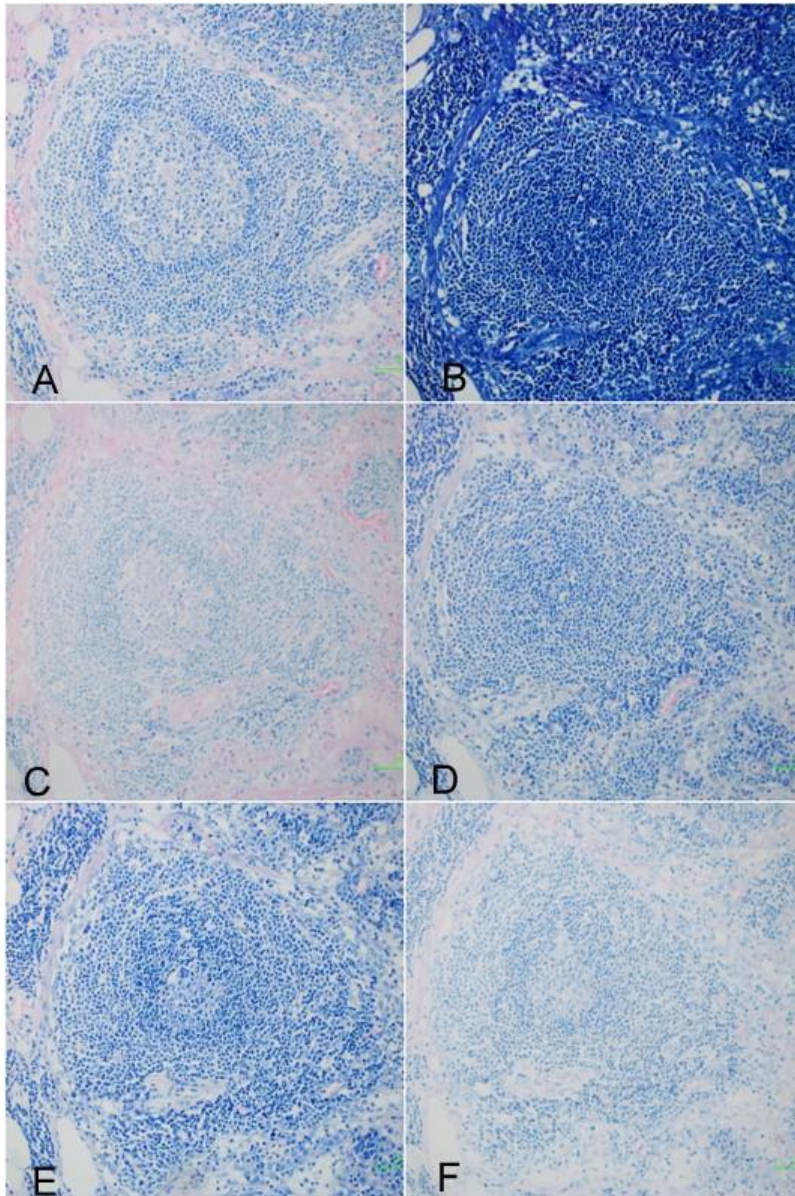
Kuvio 23. Hematologinen giemsa-värjäys imusolmukekudoksessa. 20x suurennos.

Hematologisessa giemsa-värjäyksessä virhelähteitä ovat: laimean etikkahapon korvaaminen aqualla, 1 %:n vahvuinen etikkahappoliuos, liian laimea etikkahappoliuos, 96-prosenttisen etanolin korvaaminen absoluuttisella etanolilla ja 50-prosenttinen Giemsa-väriliuos. (Eberhardt – Salo 2015.)

Kuviossa 24 on esitelty hematologisen giemsa-värjäyksen virhelähteet imusolmukekudoksessa. Kuvioissa 24b ja 24e voidaan huomata kuinka laimean etikkahappoliuoksen korvaaminen aqualla tai liian laimea etikkahappoliuos liuottaa sinistä väriä heikosti tai ei lainkaan, jolloin kudoksesta jää liian siniseksi. Kuviossa 24c voidaan sen sijaan huomata, kuinka liian vahva etikkahappoliuos liuottaa liikaa sinistä väriä, jolloin värjäysintensiteetistä tulee haaleampi kuin oikein värjättyssä näytteessä ja näyte jää liian punertavaksi. Kuviossa 24d absoluuttisen etanolin käyttö 96-prosenttisen etanolin sijaan on aiheutta-



nut punaisen värin liiallisen liukenemisen, jolloin näytteestä tulee liian sinertävä. Kuviossa 24f värjäyksessä on käytetty liian vahvaa giemsa-väriliuosta. Värjäysintensiteetti on jäänyt liian haaleaksi, koska näytettä on differoitu liikaa. Tämä johtuu siitä, että leike on näyttänyt värjäytyneen liian vahvasti johtuen vahvemmassa väriliuoksesta, jonka vuoksi ylimääräistä väriä on yritetty differoida pidemmän aikaa pois. Lyhyemmällä differoinnilla väri-intensiteetti luultavasti saataisiin sopivaksi, jolloin väriliuoksen vahvuudella ei olisi merkitystä.

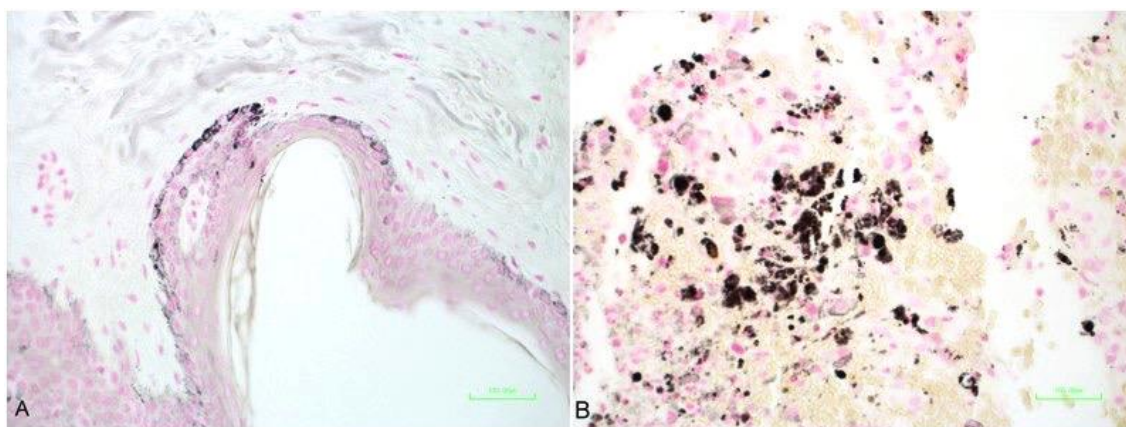


Kuvio 24. Hematologisen giemsa-värjäyksen virhelähteet A) oikean protokollan mukaan värjätty näyte B) Differentiaatiovaiheessa käytetty aquaa laimean etikkahapon sijaan C) 1 % etikkahappoliuos D) Absoluuttinen etanoli 96 % etanolin sijaan E) liian laimeaa etikkahappo F) 50 % vahvuinen Giemsa- väriliuos. 20x suurennokset.



## 7.6 Masson-Fontana-värjäys

Masson-Fontana-värjäyksessä melaniini, osa lipofuskiineista ja argentaffiinisten solujen granulat värjäytyvät mustiksi. Solujen tumat värjäytyvät punaisiksi. Masson-Fontana-värjäys tehdään usein melaniinia sisältävistä kudoksista, kuten ihosta ja sitä käytetään muun muassa melanoomien diagnostiikassa. (HUSLABin käsivärjäysten työohjeet. 2014.) Kuviossa 25 on esitetty Masson-Fontana-värjäyksen tuloksia ihokudoksessa sekä runsaasti melaniinia sisältävässä kontrollikudoksessa, joka myös on ihokudosta. Normaalisti ihokudoksesta tulisi löytyä melaniinia vain ihon pintakerroksen, eli epidermiksen soluista. Kuvassa epidermiksen solut ovat värjäytyneet punaisiksi, ja niissä oleva melaniini näkyy mustina pisteinä. Värjäyksessä käytetään aina positiivista kontrollia, jotta voidaan varmistaa värjäyksen onnistuminen. Oppimateriaalissamme Masson-Fontana-värjäyksestä esitetään lukijalle aktivoivia kysymyksiä: Miten melaniini värjäytyy kudoksessa? Miten tumat värjäytyvät?

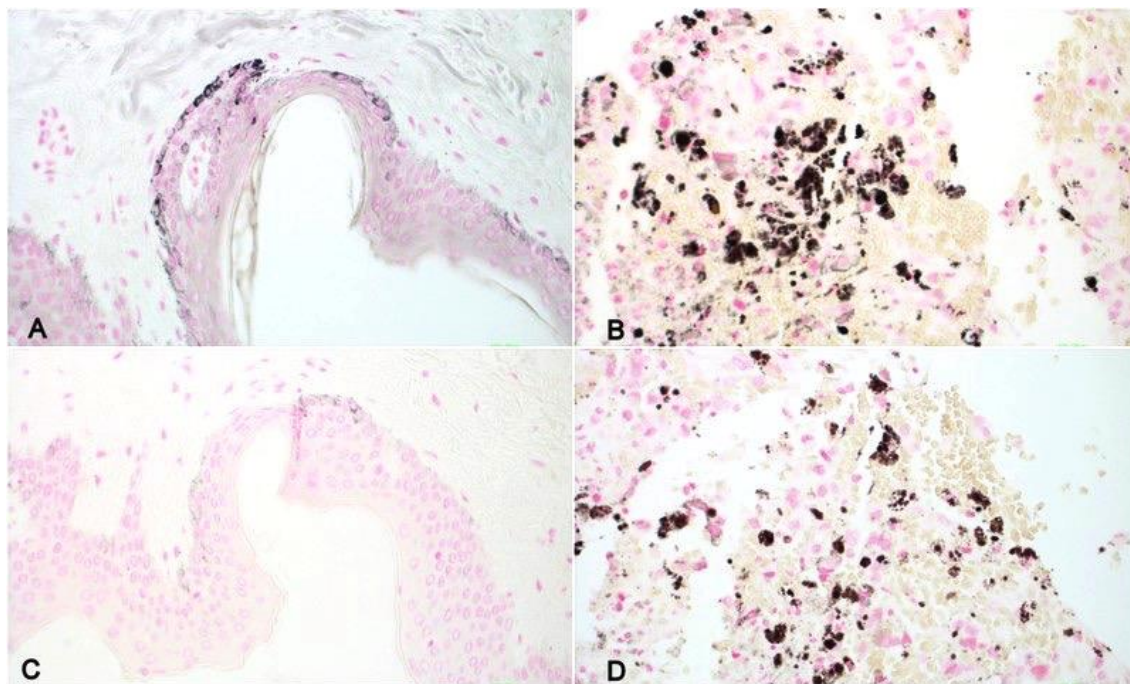


Kuvio 25. Masson-Fontana-värjäys A) ihokudos B) kontrollinäyte. 40x suurennokset.

Masson-Fontana-värjäyksessä virhelähteenä on neljä kuukautta huoneenlämmössä, valolle altistettuna vanhenneen hopeanitraattiliuoksen käyttö (Eberhardt – Salo 2015).

Kuviossa 26 on esitelty Masson-Fontana-värjäyksen virhelähteet iho- ja kontrollikudoksessa. Kuvioissa 26a ja 26b on normaalin protokollan mukaan suoritetun värjäyksen tulokset ja kuvioissa 26c ja 26d vanhenneella hopeanitraattiliuoksella värjäytyneet kudokset. Kuvioita vertaamalla voi huomata vanhenneella hopeanitraattiliuoksella värjäytyneiden näytteiden värien intensiteetin olevan huomattavasti haaleamman ja ihokudoksessa olevan melaniinin värjäytyneen huonosti tai ei ollenkaan. Tämä voi johtua hopeanitraatin heikentyneestä kyvystä tunkeutua kudokseen, jolloin hopean pelkistymis-

reaktion jälkeen kudoksessa oleva melaniini ei värjydy mustaksi. Hopeanitraattiliuos ei kuitenkaan ole täysin pilaantunut, koska se on värjännyt osittain kontrollikudoksen sisältämää melaniinia. Tämän vuoksi onkin erittäin tärkeää huomata värjäyksen epäonnistuminen varsinaisesta näyttekudoksesta, koska pelkästään kontrollia tarkastelemalla voitaisiin luulla värjäyksen onnistuneen. Vanhentuneen liuoksen voisi käytettynä johtaa väärin negatiivisiin tuloksiin ja pahimmassa tapauksessa väärään diagnoosiin.

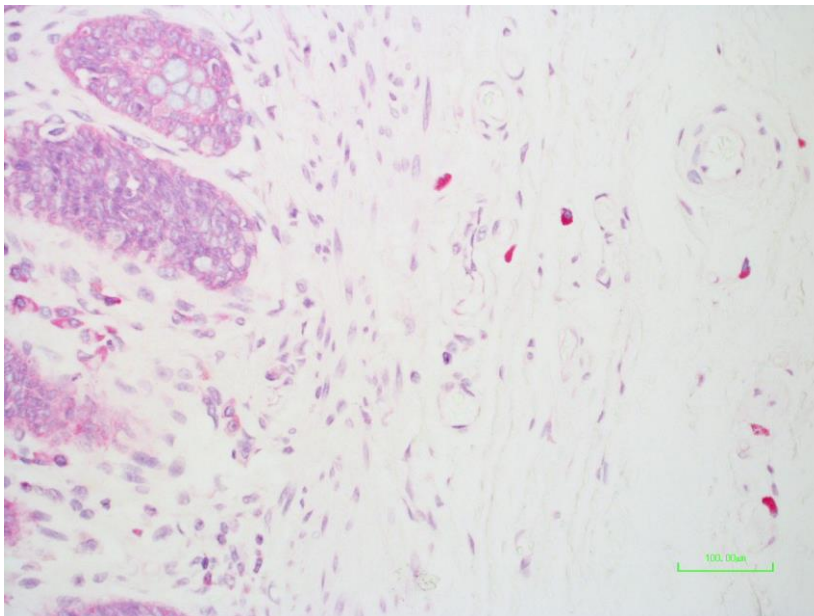


Kuvio 26. Masson-Fontana-värjäyksen virhelähteet A) näyte värjättyä oikean protokollan mukaan B) kontrollinäyte värjättyä oikean protokollan mukaan C) näyte värjättyä vanhentetulla hopeanitraattiliuoksella D) kontrollinäyte vanhentetulla hopeanitraattiliuoksella. 40x suurennokset.

## 7.7 Unna-Pappenheim-värjäys

Unna-Pappenheim-värjäyksessä käytettävän metyyli vihreä-pyroniini- väriliuoksen pyroniini värjää RNA:ta punaiseksi. RNA:ta on runsaasti proteiineja syntetisoivien solujen, kuten plasmasolujen, sytoplasmassa. Metyyli vihreä värjää tumissa sijaitsevan DNA:n sini-vihreäksi. (HUSLABin käsivärjäysten työohjeet. 2014.) Kuviossa 27 on esitetty Unna-Pappenheim-värjäyksen tuloksia suolikudoksessa. Kyseistä värjäystä käytetään harvoin suolikudoksen värjäämiseen, mutta koska käyttämässämme imusolmukekudoksessa ei ollut riittävästi aktiivisia, proteiineja syntetisoivia soluja, päätimme käyttää kudosta josta näitä varmasti löytyisi. Kuviossa 27 näitä soluja voi nähdä kudoksessa

kirkkaanpunaiseksi värjäytyneenä suolen submukoosassa. Oppimateriaalissamme Unna-Pappenheim-värjäyksestä annetaan aktivoivia kysymyksiä: Mieti, miten RNA ja DNA värjäytyvät?

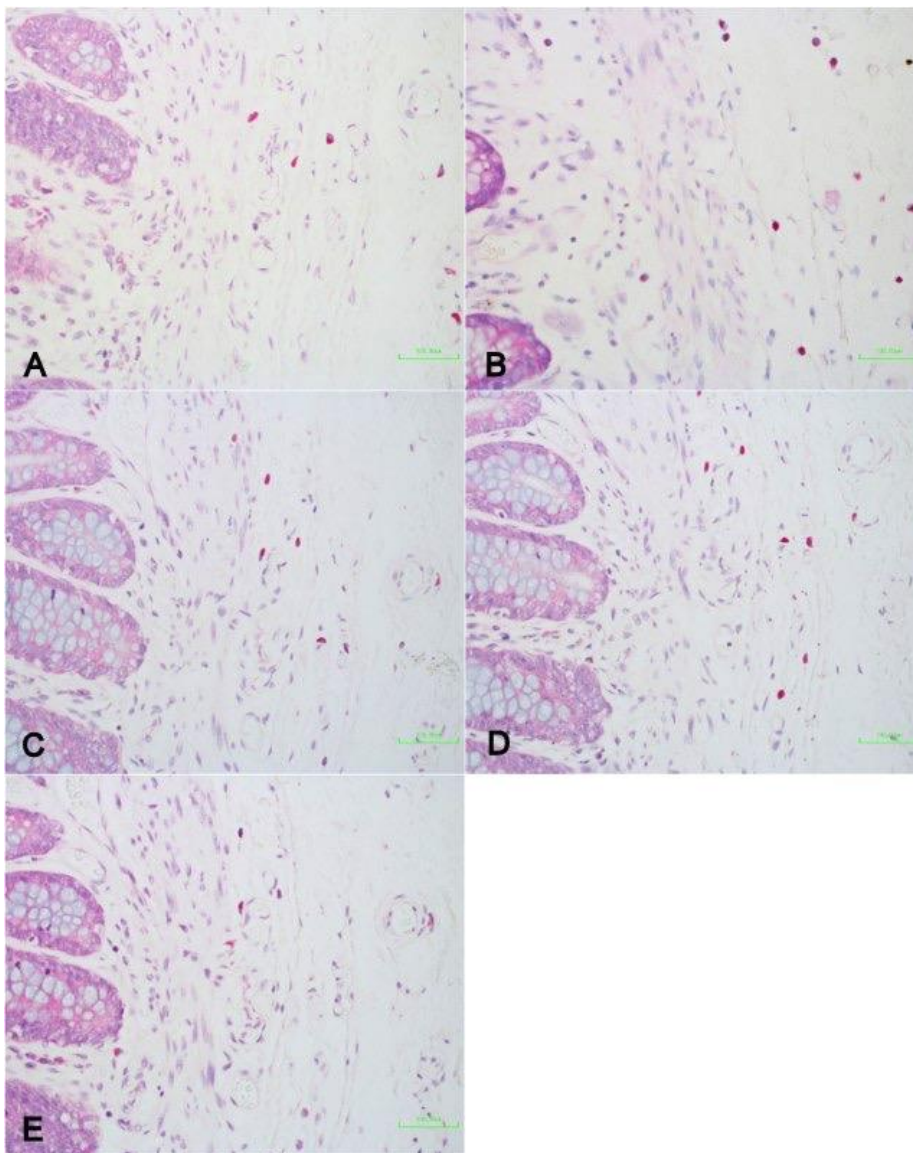


Kuvio 27. Unna-Pappenheim-värjäys suolikudoksessa. 40x suurennos.

Unna-Pappenheim-värjäyksessä virhelähteitä ovat: neljä kuukautta huoneenlämmössä, valolle altistettuna vanhentunut väriliuoksen käyttö ja pidennetyt butanolikäsittelyt (Eberhardt – Salo 2015).

Kuviossa 28 on esitelty Unna-Pappenheim-värjäyksen virhelähteet suolikudoksessa. Kuviossa 28b on värjäyksessä käytetty vanhentettua väriliuosta. Värjäystuloksessa ei näy merkittäviä eroja verrattuna normaalin protokollan mukaan värjättyyn leikkeeseen (kuvio 28a): aktiiviset plasmassolut ja niiden sytoplasmat ovat värjäytyneet selkeästi kirkkaanpunaisella ja muut kudoksen osat ovat värjäytyneet saman sävyisiksi. Kuvioissa 28c, 28d ja 28e on kuvat värjäyksistä, joissa on käytetty pidennettyä butanolikäsittelyä. Oikean protokollan mukaan dehydraatio suoritetaan kolmella kahden minuutin butanolikäsittelyllä, eli dehydraatio kestää yhteensä kuusi minuuttia. Tuloksista voidaan huomata, että jopa kolmeen tuntiin pidennetyllä butanolikäsittelyllä (kuvio 28e) ei ole minkäänlaista merkitystä näytteen värjäytyvyydelle. Tästä voidaan siis tehdä johtopäätös, että butanolikäsittelyn pidennetyllä kestolla ei voida pilata näytteen värjäyslaatua.





Kuvio 28. Unna-Pappenheim-värjäys A) Näyte värjättyä oikean protokollan mukaan B) näyte värjätty vanhennetulla väriliuoksella C) näytteen 12 minuutin butanolikäsittely D) näytteen 30 minuutin butanolikäsittely E) näytteen 3 tunnin butanolikäsittely. 40x suurennokset.

## 7.8 Tuloksien luotettavuus

Jokainen värjäys suoritettiin HUSLABin käsi- ja Artisan-värjäysten työohjeita noudattamalla. Oikean protokollan mukaan suoritettavat värjäykset tehtiin tuoreilla, käyttökelpoisilla liuoksilla, jotta värjäystuloksesta tulisi vertailukelpoinen. Kaikki kudokset leikattiin ohjaajan ollessa läsnä, jotta kudoksen orientaatio onnistuisi. Kudokset prosessoitiin yhtä aikaa ja leikkaamisessa käytettiin samaa vesiliukumikrotomia. Sama henkilö leikkasi näyteleikkeet jokaista eri värjäystä varten, jotta leikkausjälki olisi mahdollisimman

samanlainen. Jokaisessa värjäyksessä myös leikepaksuus määriteltiin samaksi, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia ja ettei leikepaksuuden muutokset häiritsisi tulosten tulkintaa. Käytimme myös kontrollikudoksia värjäyksissä, joissa näitä käytetään normaalistikin, jotta värjäyksen onnistuminen pystyttiin varmistamaan. Opinnäytetyötämme edeltävällä harjoittelujaksolla saimme laboratorion henkilökunnalta muutaman viikon intensiiviperhdytyksen käsivärjäykseen ja ArtisanLink-värjäysautomaatin käyttöön, jonka avulla pystyimme suorittamaan värjäykset itsenäisesti.

Kävimme osan värjäystuloksistamme läpi ohjaajiemme Kirsi Eberhardtin ja lida Salon kanssa. Emme kuitenkaan kokeneet tarpeelliseksi käydä kaikkia värjäystuloksia ohjaajiemme kanssa läpi, koska niiden onnistumisen varmistaminen oli todella selkeästi tulkittavissa. Asetyylkolinesteraasi-värjäyksen tulokset tarkastelimme yhdessä patologi Jouko Lohin kanssa, koska kyseinen värjäys on haastava tulkittava jopa laboratoriohenkilökunnalle.

## 8 Yhteenveto

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää seitsemän osoitusvärjäyksen yleisimmät virhelähteet ja luoda niiden pohjalta oppimateriaali. Työmme toteutettiin HUSLABin Meilahden patologian laboratoriossa. Valmistunut oppimateriaali tulee patologian laboratorion henkilökunnan sekä Metropolia Ammattikorkeakoulun opiskelijoiden käyttöön.

Virhelähteiden merkitys vaihteli huomattavasti eri värjäyksien kesken. Osassa värjäyksistä toteutettujen virheiden merkitys näkyi voimakkaasti, kun taas joissain värjäyksissä virheiden vaikutukset olivat olemattomat. Voimakkaita ja tulkinnan kannalta merkittäviä muutoksia havaittiin muun muassa gram-värjäyksessä, jossa vanhentuneen jodiliuoksen käyttö aiheutti väriä negatiivisia tuloksia. Hyvänä esimerkkinä virhelähteiden vaikuttamattomuudesta värjäystulokseen oli Unna-Pappenheim-värjäyksessä käytetty pidennetty butanolikäsittely, jolla ei ollut lainkaan vaikutusta värjäystulokseen.

Työmme tulokset koottiin yhteen oppimateriaaliksi, jossa työmme tarkoitus ja värjäysten teoria on kerrottu lyhyesti sekä virhelähteiden tulokset on esitelty kuvien avulla. Olemme myös sisällyttäneet tekstiin aktivoivia kysymyksiä tukemaan lukijan oppimista.

## 9 Pohdinta

Opinnäytetyöprosessin alussa laadimme suunnitelman, minkä pohjalta lähdimme toteuttamaan työtämme. Laadimme aikataulusuunnitelman, jonka avulla aloimme rakentaa työtämme. Pää tavoitteemme aikataulullisesti oli suorittaa tiedonhaku ja teoreettisen osuuden kokoaminen ennen empiirisen osuuden aloittamista, missä onnistuimmekin kiitettävästi. Empiirinen osuus toteutettiin kolmessa viikossa ja sitä edeltävän harjoittelujakson ansiosta pystyimme suoriutumaan työstä hyvin pitkälti itsenäisesti. Osan empiirisestä osuudesta, kuten kudosten käyntiinpanon, valamisen ja leikkaamisen pystyimme suorittamaan harjoittelujaksomme aikana, mikä nopeutti työskentelyämme. Tavoitteenamme oli valmistaa laadukkaat ja tasalaatuiset leikkeet käsittelemiämme osoitusvärjäyksiä varten, missä onnistuimme mielestämme erittäin hyvin, sillä kuvien perusteella värjäystuloksiin ei tullut häiriöitä leikepaksuudesta johtuen.

Opinnäytetyömme empiiristä osuutta tehdessä pääsimme havainnoimaan laboratorion käsivärjäystyöpisteen henkilökunnan työskentelyä. Huomasimme, että osa värjäyksistä suoritetaan rutiininomaisesti, kun taas osassa huomattiin epävarmuutta värjäyksen suorittamisen suhteen. Virheitä värjäyksiä tehdessä voikin tapahtua liiasta rutiinista tai epävarmuudesta johtuen, minkä vuoksi niiden seuraukset on tärkeää olla tiedossa. Työpisteen työntekijä tarkistaa aina värjäyksen onnistumisen mikroskoopilla, minkä vuoksi olisi hyödyllistä tietää miltä eri virhelähteet eri värjäysten kohdalla näyttävät. Oppimateriaalimme on myös tästä syystä hyödyllinen väline tukemaan osoitusvärjäyksen suorittamista ja erityisesti värjäystulosten arviointia. Suoritimme empiirisessä osuudessa osoitusvärjaukset ja niiden virhelähteet huolellisesti ja tarkasti. Näiden pohjalta laadimme mielestämme selkeän oppimateriaalin histologisista osoitusvärjäyksistä ja niiden virhelähteistä tukemaan patologian laboratorion henkilökunnan jokapäiväistä työskentelyä.

Huomasimme tuloksia tarkasteltaessa, että kaikkien työvaiheiden suorittaminen pilkuntarkasti ei ole aina välttämätöntä värjäyksen onnistumisen kannalta. Esimerkiksi joissakin värjäyksissä joidenkin työvaiheiden kestoilla ei ollut merkitystä värjäystulokseen. On kuitenkin tärkeää muistaa, että värjäysprotokollat ovat standardoitu sen takia, jotta toistettavuus värjäysten välillä toteutuisi. Joissakin värjäyksissä on erityisen tärkeää, että värjäysprotokolla on tarkkaan standardoitua. Hyvä esimerkki tästä on asetylkolinesteraasi-värjäys, jossa harvoin ilmenee positiivisia tuloksia. Positiivisenkin tuloksen havaitseminen saattaa olla patologille erittäin haasteellista, jolloin on erittäin tärkeää tie-

tää, että värjäys on suoritettu oikein. Käytimme työssämme tervettä suolikudosta aseptylkolinesteraasi-värjäyksessä, joten emme pysty tuloksiemme perusteella päättämään, miten virhelähteet vaikuttaisivat positiivisen kudokseen. Jos virhelähteiden vaikutusta haluttaisiin tarkemmin selvittää, tulisi ne suorittaa mahdollisimman positiivisella kudoksella.

Vaikka saimmekin virhelähteitä toteuttaessamme merkittäviäkin tuloksia, on kuitenkin melko epätodennäköistä, että jotkut näistä virhelähteistä todellisuudessa tapahtuisivat. Esimerkiksi neljä kuukautta vanhennettujen liuosten käyttäminen olisi lähes mahdotonta, koska liuosten käyttöönottopäivämäärät merkataan aina liuosten säilytysastioihin ja niiden säilyvyys ja säilytysohjeet on merkitty erikseen työohjeissa. Osaa virhelähteistä liioiteltiin, jotta tuloksia varmasti saataisiin ja että oppimateriaalia lukeva työntekijä tai opiskelija ymmärtäisi niiden syy-seuraussuhteen. Kuitenkin itse valmistettujen liuosten, kuten differointiliuosten väärin valmistaminen olisi mahdollista ja vaikutukset merkittäviä. Työssämme ei käsitelty kaikkia Meilahden patologian laboratorion käytössä olevia osoitusvärjäyksiä, koska työstämme olisi tullut liian laaja. Jatkotutkimukseksi voisikin ajatella esimerkiksi ArtisanLink-värjäysautomaatilla suoritettujen osoitusvärjäysten virhelähteitä ja niistä työstettävää oppimateriaalia.

## Lähteet

- Bancroft, John D. – Cook, Harry C. 1994. Manual of histological techniques and their diagnostic application. UK: Churchill Livingstone.
- Bancroft, John D. – Gamble, Marilyn 2008. Theory and practice of histological techniques. 6. painos. UK: Elsevier Limited.
- Bancroft, John D. – Layton, Christopher – Suvarna, Kim S. 2013. Bancroft's Theory and practice of histological techniques. 7. painos. UK: Elsevier Limited.
- Barcia, JJ. 2007. The Giemsa stain: its history and applications. International Journal of Surgical Pathology 15 (3). 292–296.
- Dako 2015. Verkkodokumentti. <<http://www.dako.com/fi/>>. Luettu 18.9.2015.
- Das, Kanishka – Kini, Usha – Mohanty, Suravi – Puttegowda, Divya – Yadav, Lokendra 2014. Calretinin immunohistochemistry versus improvised rapid Acetylcholinesterase histochemistry in the evaluation of colorectal biopsies for Hirschsprung's disease. Indian Journal of Pathology & Microbiology 57 (3). 369–375.
- Duodecim Oppikirjat 2015. Bakteriologian perustekniikat. Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. Päivitetty 2015.  
<[http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/oppi/koti?p\\_artikkeli=pat00732&p\\_haku=gram%20v%C3%A4rj%C3%A4ys](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi/dtk/oppi/koti?p_artikkeli=pat00732&p_haku=gram%20v%C3%A4rj%C3%A4ys)>. Luettu 17.8.2015.
- Eberhardt, Kirsi 2015. Bioanalytiikka. HUSLAB Patologian keskuslaboratorio. Helsinki. Haastattelu 2.2.2015.
- Engeström, Yrjö 1987. Perustietoa opetuksesta. Verkkojulkaisu.  
<<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10224/3665/engestr%C3%B6m1-175.pdf?sequence=>>>. Luettu 12.4.2015.
- Guide to Special Stains. 2004. DakoCytomation. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa  
<[http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main\\_pages/timetable/Tutorials/2008/DAKO.guide\\_to\\_special\\_stains.pdf](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main_pages/timetable/Tutorials/2008/DAKO.guide_to_special_stains.pdf)>.
- HUSLAB. 2014. Käsivärjäysten työohjeet.
- HUSLAB. 2015. Artisan-värjäysten työohjeet.
- Itä-Suomen yliopisto. 2015. Tunnistatko oppimistyyli? Verkkodokumentti  
<<http://www.uef.fi/fi/aducate/oppimistyyli>>. Luettu 18.3.2015.
- Junqueira, L. Carlos – Carneiro, José – Kelley, Robert O. 1995. Basic Histology. 8. painos. USA: Appleton & Lange.
- Koponen, Arja – Hämäläinen, Riitta 2010. Tarinoita oppimisesta ja opettamisesta. Luk-Sitko. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa  
<[http://www.erilaistenoppijoidenliitto.fi/wp-content/uploads/2012/02/Oppimistyyliit-Opetuksessa-\\_LS1\\_2010\\_uusi.pdf](http://www.erilaistenoppijoidenliitto.fi/wp-content/uploads/2012/02/Oppimistyyliit-Opetuksessa-_LS1_2010_uusi.pdf)>.



Lohi, Jouko 2015. Patologi. HUSLAB Meilahden Patologian laboratorio. Helsinki. Haastattelu 21.10.2015.

Meurman, Olli 2010. Gram-värjäykset. TYKSLAB. Verkkodokumentti. Päivitetty 5.2.2010. <<http://www.labquality.fi/@Bin/2306734/Meurman+Gram+nettiin.pdf>>. Luettu 17.8.2015.

Moore, S. W. – Johnson, G. 2005. Acetylcholinesterase in Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International* 21 (4). 255–256.

Mäkinen, M. – Stenbäck, F. 2012. Patologia. Duodecim. 1. painos.

Naukkarinen A. 2000. Histologiset värjäykset. *Moodi* 24: 153–158.

Parry, Nicola 2014. Verhoeff-van Gieson Stain: A Special Histology Stain for Elastic Fibers. *Microscopy & Imaging*. Verkkodokumentti. Päivitetty 15.4.2014. <<http://bitesizebio.com/19952/verhoeff-van-gieson-stain-a-special-histology-stain-for-elastic-fibers/>>. Luettu 18.9.2015.

Salo, Iida 2015. Bioanalytiikka. HUSLAB, Patologian keskuslaboratorio. Helsinki. Haastattelu 2.2.2015.

Suomen virtuaaliyliopisto. Solunetti 2006. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/>>. Luettu 22.8.2015.

The Internet Pathology Laboratory for Medical Education: Histotechniques. Verkkodokumentti. <<http://medlib.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTO.html>>. Luettu 22.8.2015.

Tilastokeskus. Verkkodokumentti. <<http://www.stat.fi/meta/kas/itseopiskelu.html>>. Luettu 1.10.2015.

Verhoeff-Van Gieson (VVG) Staining Protocol for Elastic Fibers. 2011. IHC World. Verkkodokumentti. <[http://www.ihcworld.com/\\_protocols/special\\_stains/vvg.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/vvg.htm)>. Luettu 18.9.2015.

Veuthey, Tania – Dodero, Veronica 2014: Dyes and Stains: from molecular structure to histological application. *Frontiers in Bioscience* No. 19. 91–112.

Virtuaali-ammattikorkeakoulu. Verkkodokumentti. <<http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojaksot/041005/1081111669900/1085399771565/1085399817363/1085400362423.html>>. Luettu 1.10.2015.

<b>Käytetty kemikaali</b>	<b>Kemikaalin valmistaja</b>
Giemsa	Merck
Fosfaattipuskuri	Reagena
Etikkahappo	Sigma-Aldrich
2-propanoli	Sigma-Aldrich
Hoopenitraatti	Merck
Kernechtrot	HUSLAB liuoslaboratorio
Kultakloridi	Riedel-de Haen
Natriumtiosulfaatti	Merck
1-butanoli	Sigma-Aldrich
2 % Methyl green	Yliopiston apteekki
2 % Pyronin Y	Yliopiston Apteekki
Walpolen HCl-Na-asettaattipuskuri pH 3.8	Yliopiston Apteekki
Etanoli	Altia
Ksyleeni	Oy AFF-Chemicals ab
Kaliumferrosyanidi	Riedel- de Haen
Suolahappo	Merck
ACE	HUSLAB Liuoslaboratorio
Potassium ferrocyanide	HUSLAB Liuoslaboratorio
Natriumasetaatti	HUSLAB Liuoslaboratorio
Ammoniumoksaalaatti	Riedel-de Haen
Asetoni	Sigma-Aldrich
Kaliumjodidi	Merck
Kristallivioletti	Merck
Jodi	Riedel-de Haen
Neutral red	HUSLAB Liuoslaboratorio

<b>Asetylokolinesteraasi-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset</b>
Kantaliuos 1: ACE
Kantaliuos 2: Inkubaatioliuos B Potassium ferrocyanide 5mM
Kantaliuos 3: Natriumasetaatti 0,1 mol/l
Käyttöliuos 1: Inkubaatioliuos B + ACE
Käyttöliuos 2: Mayerin hematoksyliini

<b>Elastiset säikeet-värjäys (ArtisanLink)</b>
Reagenssi 1: Alcoholic hematoxylin 5 %
Reagenssi 2: Ferric Chloride 10 %
Reagenssi 3: Lugol's Iodine
Reagenssi 4: Van Gieson Solution

<b>Berliininsini-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset</b>
Kantaliuos 1: HCl 20 %
Kantaliuos 2: Kaliumferrosyanidi 10 %
Käyttöliuos 1: Rautaliuos
Käyttöliuos 2: Kernechtrot 0,1%

<b>Berliininsini-värjäyksen reagenssit (ArtisanLink)</b>
Reagenssi 1: Potassium Ferrocyanide 10 %
Reagenssi 2: Hydrochloris Acid 10 %
Reagenssi 3: Nuclear Fast Red

<b>Gram-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset</b>
Käyttöliuos 1: Hucker- Conn ammoniumoksaatti kristallivioletti
Käyttöliuos 2: Lugolin liuos
Käyttöliuos 3: Asetoni
Käyttöliuos 4: Neutral red- liuos 1 %

<b>Hematologinen giemsa-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset</b>
Kantaliuos 1: Giemsa- liuos
Kantaliuos 2: Fosfaattipuskuri 1:20
Käyttöliuos 1: 10 % Giemsa- liuos
Käyttöliuos 2: Laimea etikkahappo
Käyttöliuos 3: 96 % etanoli

<b>Masson-Fontana-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset</b>
Kantaliuos 1: Alkalinen hopeanitraatti
Kantaliuos 2: Kultakloridi 1 %
Käyttöliuos 1: Hopeanitraattiliuos
Käyttöliuos 2: Kernechtrot 0,1 %
Käyttöliuos 3: Kultakloridi 0,2 %
Käyttöliuos 4: Natriumtiosulfaatti 5 %

<b>Unna-Pappenheim-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset</b>
Kantaliuos 1: 2 % Methyl green
Kantaliuos 2: 2 % Pyronin Y
Kantaliuos 3: Walpolen HCl-Na-asettaattipuskuri pH 3,8
Käyttöliuos: Methyl-green pyronin

**Asetyilkolinesteraasi-värjäyksen protokolla**

Ilmakuivaus huoneenlämmössä
Käyttöliuoksen 1 esilämmitys +37 °C
ACE +37 °C
Aqua
Mayerin hematoksyliini
Aqua
50 % etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
Ksyleeni
Ksyleeni
Peittely automaatilla

**Berliininsini-värjäyksen protokolla (käsivärjäys)**

Ksyleeni
Ksyleeni
Ksyleeni
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
50 % etanoli
Aqua
Rautaliuos
Aqua
Kernechtrot
Aqua
50 % etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
Ksyleeni
Peittely automaatilla

**Berliininsini-värjäyksen protokolla (ArtisanLink)**

Clearing Solution
Pesuliuksen poisto laseilta
Potassium ferrocyanide + hydrochlorid acid +37 °C
Huuhtelu x 6
Nuclear fast red +37 °C
Huuhtelu x 6
Absoluuttinen etanoli
Ksyleeni
Ksyleeni
Peittely automaatilla

**Elastiset säikeet-värjäyksen protokolla (ArtisanLink)**

Clearing solution (parafiinin poisto)
Pesuliuksen poisto
Alcoholic Hematoxyllin + Ferric Chloride + Lugol's Iodine
Huuhtelu x 7
Pesuliuos ja Ferric Chloride
Huuhtelu x 5
Van Gieson
Huuhtelu x 4
Absoluuttinen etanoli
Ksyleeni
Ksyleeni
Peittely automaatilla



**Gram-värjäyksen protokolla**

Ksyleeni
Ksyleeni
Ksyleeni
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
50 % etanoli
Aqua
Hucker- Conn kristallivioletti
Juokseva vesi
Aqua
Asetoni
Juokseva vesi
Aqua
1 % Neutral red
Aqua
Leikkeen kuivaus
Asetoni
Ksyleeni
Ksyleeni
Peittely automaattilla

**Masson-Fontana-värjäyksen protokolla**

Ksyleeni
Ksyleeni
Ksyleeni
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
50 % etanoli
Aqua
Hopeanitraatti
Aqua
Kultakloridi
Aqua
Natriumtiosulfaatti
Aqua
Kernechtrot
Aqua
50 % etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
Ksyleeni
Peittely automaattilla

**Hematologisen giemsa-värjäyksen protokolla**

Ksyleeni
Ksyleeni
Ksyleeni
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
50 % etanoli
Aqua
Giemsa
Laimea etikkahappo
96 % etanoli
2-propanoli
2-propanoli
2-propanoli
Ksyleeni
Peittely automaatilla

**Unna-Pappenheim-värjäyksen protokolla**

Ksyleeni
Ksyleeni
Ksyleeni
Absoluuttinen etanoli
Absoluuttinen etanoli
96 % etanoli
96 % etanoli
50 % etanoli
Aqua
Methyl-green-pyronin käyttöliuos
Aqua
Aqua
Kuivaus imupaperilla
1-butanol
1-butanol
1-butanol
Ksyleeni
Peittely automaatilla