

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

2018

Elina Varjola

**KAHDEN  
KUDOSPROSESSOINTIOHJEL-  
MAN VERTAILU RINTA- JA  
KOHTUNÄYTTEILLÄ**

Elina Varjola

## KAHDEN KUDOSPROSESSOINTIOHJELMAN VERTAILU RINTA- JA KOHTUNÄYTTEILLÄ

Histologia on diagnostiseen patologiaan kuuluva lääketieteen erikoisala, jossa tutkitaan erilaisten ja erikokoisten kudosnäytteiden rakennetta ja toimintaa. Fiksoidun histologisen kudosnäytteen kulku laboratoriossa alkaa sisään kirjauksesta ja jatkuu esikäsittelyn kautta kudosprosessointiin, jonka jälkeen näyte valetaan parafiiniin. Koko prosessin lopputuloksena on objektilasille kiinnitetty ja värjätty ohuen ohut kudosleike, jonka patologiaan erikoistunut lääkäri tutkii valomikroskoopilla.

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Päijät-Hämeen laboratoriolaitokseen kuuluvassa patologian laboratoriossa Päijät-Hämeen keskussairaalassa. Tarkoituksena oli prosessoida normaali- ja makrokokoisia rinta- ja kohtukudosnäytteitä kolme päivää kestäväällä (ohjelma 1) sekä kaksi päivää kestäväällä (ohjelma 2) kudosprosessointiohjelmilla. Vertailemalla näytteiden leikkautumista, värjäytymistä ja morfologiaa haluttiin selvittää, saadaanko lyhyemmällä prosessointiohjelmalla yhtä hyviä tuloksia kuin pidemmällä ohjelmalla. Tavoitteena oli, että patologian laboratoriossa voitaisiin prosessoida rasvakudosta sisältävät näytteet sekä erilaiset makrokokoiset näytteet entisen kolmen päivän sijaan kahdessa päivässä.

Tutkimuksessa ohjelmien 1 ja 2 välillä ei havaittu merkittävää eroa normaali- tai makrokokoisten rintänäytteiden leikkautuvuudessa tai kudismorfologiassa. Sen sijaan normaalikokoisten rintänäytteiden värjäytymisen kannalta ohjelma 2 näytti olleen hieman huonompi vaihtoehto. Kaikkien kohtunäytteiden leikkautuminen, morfologia ja värjäytyminen oli moitteetonta. Tulosten perusteella normaali- ja makrokokoiset rasvakudosta sisältävät näytteet sekä muut makrokokoiset näytteet voidaan prosessoida kudosprosessointiohjelmalla, joka kestää kaksi päivää. Nopeampi kudosten prosessointi lyhentää diagnostiikkaan kuluvaa aikaa ja aikaistaa potilaan hoitoa.

### ASIASANAT:

Histologia, kudosprosessointi, kudosnäyte, kudismorfologia, värjäytyminen, rintakudos, kohtukudos

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in biomedical laboratory science | Pathology

Autumn 2018 | 34 +3

Elina Varjola

# THE COMPARISON OF TWO TISSUE PROCESSING SCHEDULES WITH BREAST AND UTERUS SAMPLES

Histology is a special field of diagnostic pathology that involves the study of the microscopic structure and function of different tissue samples. In laboratory the path of the fixed histological tissue samples starts with identification and labeling of the sample, and proceeds with specimen handling and grossing. After that the sample is processed and embedded in paraffin wax. The outcome of this process is thin stained paraffin section on the microscope slide that is analyzed by physician practicing pathology.

This thesis was made in the laboratory of pathology in the central hospital of Päijät-Häme. The intension of this thesis was to process breast and uterus tissue samples in normal and macro size with 3-day schedule (schedule 1) and 2-day schedule (schedule 2). The purpose was to compare the sectioning, staining, and tissue morphology of the samples, and examine if it is possible to get as good results with shorter schedule as with the longer schedule. The aim was that fatty tissue samples and different macro size samples could be processed in 2 days instead of 3 days in the laboratory of pathology.

No significant differences were found in sectioning and tissue morphology between samples in schedules 1 and 2. However staining appeared to be better after schedule 1 because the eosin-stained structures in breast samples were a bit too light after schedule 2. The sectioning, staining, and morphology of all the uterus samples were good. The results showed that fatty tissue samples in normal and macro size and other samples in macro size can be processed with tissue processing schedule that takes 2 days. More rapid tissue processing reduces the time spent in tissue diagnostics and advances the treatment of patients.

## KEYWORDS:

Histology, tissue processing, tissue sample, tissue morphology, staining, breast tissue, uterus tissue

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 HISTOLOGISEN KUDOSNÄYTTEEN KÄSITTELY LABORATORIOSSA</b>	<b>7</b>
2.1 Histologia	7
2.2 Kiinnittäminen eli fiksaatio	7
2.3 Sisäänkirjaus	9
2.4 Esikäsittely	9
2.5 Kudosprosessointi	10
2.6 Parafiinivalu	11
2.7 Mikrotomia	11
2.8 Värjääminen	12
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE</b>	<b>14</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS</b>	<b>15</b>
4.1 Opinnäytetyön käytännön toteutus	15
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	16
4.3 Opinnäytetyön eettisyys	17
<b>5 TUTKIMUSTULOKSET</b>	<b>19</b>
5.1 Näytteiden leikkautuminen	19
5.2 Näytteiden värjäytyminen	20
5.3 Näytteiden kudismorfologia	23
<b>6 POHDINTA</b>	<b>26</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>31</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Kudosprosessointiohjelmat.
- Liite 2. Rintanäytteiden arviointilomake.
- Liite 3. Kohtunäytteiden arviointilomake.

## KUVAT

Kuva 1. Hyvin värjäytynyt rintanäyte (20x), ohjelma 1.	20
Kuva 2. Kohtalaisesti värjäytynyt rintanäyte (20x), ohjelma 1.	21
Kuva 3. Hyvin värjäytynyt rintanäyte (10x), ohjelma 2.	22
Kuva 4. Kohtalaisesti värjäytynyt rintanäyte (20x), ohjelma 2.	22
Kuva 5. Vasen: Kohtunäyte (20x), ohjelma 1. Oikea: Kohtunäyte (20x), ohjelma 2.	23
Kuva 6. Vasen: Rintanäyte (10x), ohjelma 2. Oikea: Rintanäyte (20x), ohjelma 2.	24

## TAULUKOT

Taulukko 1. Rintanäytteiden leikkautumiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).	19
Taulukko 2. Kohtunäytteiden leikkautumiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).	20
Taulukko 3. Rintanäytteiden värjäytymiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).	21
Taulukko 4. Kohtunäytteiden värjäytymiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).	23
Taulukko 5. Rintanäytteiden kudismorfologialle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).	24
Taulukko 6. Kohtunäytteiden kudismorfologialle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).	25

# 1 JOHDANTO

Histologia on diagnostiseen patologiaan kuuluva erikoisala, jossa tutkitaan kudoksen rakennetta ja toimintaa. Histologinen kudosnäyte voi olla esimerkiksi pieni, paikallispuudutuksessa poistettu luomi tai suurempi, leikkauksen yhteydessä poistettu kokonainen elin. Näytteet käsitellään histologian laboratorioissa erilaisilla histologisilla menetelmillä niin, että lopputuloksena on objektilasille kiinnitetty ja värjätty kudosleike, jonka patologiaan erikoistunut lääkäri tutkii valomikroskoopilla. (Terveyskirjasto Duodecim; Mäkinen 2012a; Pikander 2015; Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017.)

Väestön ikääntyminen ja sairauksien lisääntyminen ovat aiheuttaneet viime vuosina sitä, että histologian laboratorioissa myös kudosnäytteiden määrät ovat kasvaneet. Jotta laboratorioissa pystytään vastaamaan lisääntyneeseen palvelujen kysyntään, täytyy näytteiden käsittelymenetelmiä kehittää ja parantaa. (Kamel 2010; Laiho 2015.) Diagnostisen patologian kehitys onkin ollut nopeaa viimeisten vuosikymmenten aikana teknologian kehittymisen ansiosta. Histologisten näytteiden kudosprosessointiin käytettävä menetelmä on sen sijaan säilynyt pitkään lähes samanlaisena. (Helin 2007; Gupta ym. 2016.)

Kudosprosessoinnissa formaliinilla fiksoitu näyte käy läpi kolme vaihetta: dehydraatiossa kudoksesta poistetaan vesi ja fiksaatiivi nousevalla alkoholisarjalla, kirkastuksessa kudoksesta poistetaan alkoholi ksyleenillä, ja imeytyksessä kudokseen imeytetään kudostukiaine parafiini (Spencer & Bancroft 2013). Tavallisimmin kudosprosessointi kestää yön yli, mikä viivästyttää näytteiden kulkua laboratorioissa ja niin ikään potilaan diagnoosin saamista vähintään vuorokaudella (Babu ym. 2011; Gupta ym. 2016). Prosessointiin kuuluvaa aikaa on kuitenkin mahdollista vähentää muun muassa mikroaalloilla ja prosessoinnin eri vaiheita muuttamalla (Jali ym. 2015; Shrestha ym. 2015).

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja oli Päijät-Hämeen hyvinvointikuntayhtymään (PHHYKY) kuuluva Päijät-Hämeen laboratorioliikelaitos, ja se toteutettiin Päijät-Hämeen keskussairaalan (PHKS) patologian laboratorioissa. Opinnäytetyössä tarkoituksena oli prosessoida rasvakudosta sisältäviä rintakudosnäytteitä sekä kohtukudosnäytteitä kahdella eripituisella kudosprosessointiohjelmalla, ja vertailla näytteiden leikkautumista mikrotomilla, värjäytymistä ja kudismorfologiaa. Tavoitteena oli, että patologian laboratorioissa voitaisiin ottaa käyttöön nykyistä lyhyempi kudoskuljetusohjelma erikokoisille rasvakudosta sisältäville sekä rakenteeltaan tiiviimmille näytteille. Lyhyemmän prosessoinnin ansiosta näytteet saataisiin nopeammin jatkokäsittelyyn.

## 2 HISTOLOGISEN KUDOSNÄYTTEEN KÄSITTELY LABORATORIOSSA

### 2.1 Histologia

Histologia eli kudospoppi on diagnostiseen patologiaan kuuluva lääketieteen erikoisala, jossa tutkitaan kudosnäytteiden rakennetta ja toimintaa (Terveyskirjasto Duodecim; Piskander 2015). Histologiset kudosnäytteet voivat olla erilaisia tähystysten tai leikkausten yhteydessä otettuja kudospaloja tai paikallispuudutuksessa poistettuja muutoksia (Suomen Bioanalyttikoliitto ry 2017). Näytteiden koko vaihtelee pienistä, muutaman milligramman painoisista näytteistä suuriin operatiivisiin näytteisiin. Pieniä operatiivisia näytteitä ovat muun muassa ihon luomet sekä suuremmat kirurgiset näytteet, kuten umpilisäkkeet ja sappirakot. Suuret operatiiviset näytteet voivat olla esimerkiksi kasvainten tai tulehduksellisten muutosten vuoksi poistetut kokonaiset elimet, elinten osat tai elinryhmät. (Mäkinen 2012a.)

Histologiset näytteet käsitellään laboratoriossa erilaisilla histologisilla menetelmillä niin, että lopputuloksena on parafiiniin valettu kudosnäyte ja siitä tehty hyvin ohut lasille kiinnitetty ja värjätty kudisleike, jonka patologiaan erikoistunut lääkäri eli patologi tutkii valomikroskoopilla. Havaitsemiensa muutosten perusteella patologi laatii patologisanatomisen diagnoosin (PAD) eli lausunnon, josta käy ilmi koepalan rakenne ja siinä havaitut merkittävät muutokset. (Karttunen ym. 2005; Mustajoki & Kaukua 2008; Rantala 2014.)

### 2.2 Kiinnittäminen eli fiksaatio

Kudoksen kiinnittäminen eli fiksaatio on histologisten näytteiden käsittelyn ensimmäinen ja tärkein vaihe, jonka puutteellisuutta ei voi korjata millään myöhemmällä toimenpiteellä. Fiksaation tarkoituksena on säilyttää kudoksen rakenne mahdollisimman muuttumattomana, mikä tapahtuu pysäyttämällä kudoksen hajoaminen ja mätäneminen solunsisäisten entsyymien ja mikro-organismien takia. Lisäksi fiksaation tarkoituksena on helpottaa kudoksen jatkokäsittelyä, sillä se kovettaa ja kiinteyttää kudosta. (Aho 1999; Rolls 2012; Rhodes 2013.)

Kudoksen kiinnittämiseen voidaan käyttää fysikaalisia tai kemiallisia menetelmiä. Fysikaalisia fiksatiiveja ovat mikroaallot, kuumuus tai pakastekuivaus, jotka eivät ole niin yleisessä käytössä kuin kemialliset. Kemiallisista fiksatiiveista käytetyin on 10-prosenttinen puskuroitu formaliini, joka on kaasumaisen formaldehydin vesiliuoksesta valmistettu laimennos. (Rhodes 2013.)

Formaldehydin fiksatiivinen vaikutus perustuu reaktioon kudoksen proteiinien sivuryhmien kanssa, jolloin muodostuvien reaktiivisten ryhmien välille muodostuu kovalenttisia ristisidoksia. Muita kemiallisia fiksatiiveja ovat muun muassa etanoli, metanoli ja asetoni, jotka taas katkaisevat proteiinien sisältämiä hydrofobisia sidoksia poistamalla vapaan veden kudoksesta ja aiheuttaen proteiinien saostumisen. (Rolls 2012; Rhodes 2013.)

Hyvien ja toivottujen vaikutusten lisäksi kaikilla fiksatiiveilla on myös vähemmän toivottuja vaikutuksia kudoksiin. Siksi fiksatiivin valinnassa on aina tehtävä kompromissi, jossa punnitaan fiksatiivin hyvät ja huonot puolet. Useimmat fiksaatiomenetelmät aiheuttavat esimerkiksi vaihtelevasti kudoksen kutistumista tai turpoamista ja kovettumista sekä vaihtelua histologisissa värjäyksissä. Tärkeää kuitenkin on, että fiksatiivin aiheuttamat ei-toivotut vaikutukset ovat johdonmukaisia eli ne vaikuttavat kaikkiin näytteisiin samalla tavalla. (Rhodes 2013.)

Kudosnäytteet saadaan parhaiten fiksoitua fiksatiivilla, jonka pH on 6–8 eli neutraalilla tasolla. Tätä happamammalla tai emäksisemmällä fiksatiivilla solujen morfologia eli rakenne saattaa huonontua (Merriam-Webster). Lisäksi jos formaliinin pH on liian matala, kudokseen saattaa muodostua tumman ruskeaa formaliinipigmenttiä, joka haittaa kudoksen mikroskooppista tarkastelua. Neutraalin pH:n lisäksi fiksatiivin olisi hyvä olla melko laimeaa. Liian korkea konsentraatio kiinnittää kudoksen liian nopeasti, jolloin siitä tulee kovaa ja kutistunutta. Todella matala konsentraatio taas turhaan hidastaa fiksoitumista. Optimaalisen fiksatiivin valinnan lisäksi kudoksen fiksoitumista on mahdollista nopeuttaa agitaatiolla eli säännöllisin väliajoin tapahtuvalla nesteen liikkeellä. Sopiva agitaatio lisää fiksatiivin kulkeutumista kudokseen, kun taas liian hidas agitaatio on tehotonta ja liian nopea agitaatio vaurioittaa herkkiä kudoksia. (Dey 2018a.)

Fiksaation laatuun ja nopeuteen vaikuttavia tekijöitä ovat fiksatiivin ominaisuuksien lisäksi sen määrä, kudoksen koko sekä fiksaatioaika. Parhaimman fiksaation saavuttamiseksi kudospalan tulisi olla alle 4–5 millimetriä paksu, ja fiksatiivia tulisi olla vähintään 10-kertainen määrä kudospalan kokoon nähden (Päijät-Hämeen hyvinvointiyhtymä; Tyks laboratoriot). Optimaalisin fiksaatioaika taas riippuu kudospalan koosta, mutta

useimmiten vuorokauden kestävä fiksaatio on riittävä. Liian lyhyt formaliinifiksaatio voi johtaa siihen, että kudokset fiksoituvat loppuun asti vasta alkoholissa kudosten kuljetuksen alussa, mikä voi aiheuttaa kudoksen värjäytymisen epäonnistumisen ja morfologian huonontumisen (Spencer & Bancroft 2013). Liian pitkä formaliinikäsittely taas aiheuttaa kudosten kutistumista ja kovettumista. (Aho 1999; Rolls 2012; Raheem 2018.)

### 2.3 Sisäänkirjaus

Kun näyte ja sen lähete saapuvat histologian laboratorioon, näyte tunnistetaan ja kirjataan laboratorion tietojärjestelmään. Kirjauksen alussa tarkastetaan näytteen lähetetiedot, joiden on oltava riittävät ja oikeanlaiset, jotta näytteelle osataan tehdä sopivat käsittelyt ja värjäykset. Lisäksi näytteen vastaanottaja tarkistaa oikeanlaisen fiksaation ja fiksaatioaineen riittävyyden. (Rantala 2014.)

Sisäänkirjauksen yhteydessä näytteelle myös annetaan yksilöllinen, kullekin laboratoriolle ominainen numerokoodi, joka seuraa näytteen mukana koko laboratorioprosessin läpi. Koodi sisältää tiedot siitä, missä laboratoriossa näyte tutkitaan ja milloin, mikä on näytteen tyyppi sekä kuinka mones näyte on kyseessä. (Mäkinen 2012b; Spencer & Bancroft 2013; Suvarna & Layton 2013.)

### 2.4 Esikäsittely

Pienet histologiset näytteet eivät aina vaadi esikäsittelyä, joten ne voidaan suoraan sellaisenaan asettaa näyttenumerolla ja kudospalan järjestysnumerolla varustettuihin reiälisiin muovirasioihin, joita kutsutaan näyte- tai kudokaseteiksi. Suuremmat näytteet sen sijaan tarvitsevat käyntiinpanon, jossa patologi tarkastelee näytettä makroskooppisesti sekä valokuvaa/piirtää ja kirjaa tietoja näytteestä mahdollisimman tarkasti. Näin toimimalla patologi pystyy orientoitumaan näytteeseen vaivatta myöhemminkin. Makroskooppisen tarkastelun perusteella patologi ottaa edustavia kudospaloja tarvittavan määrän, näytteestä riippuen parista palasta jopa useisiin kymmeneen paloihin. Patologi asettaa kudospalat tunnistetiedoin varustettuihin, sopivan kokosiin kudokasetteihin. Kasetin koko valitaan siten, että näyte ei täytä kasettia kokonaan, jotta kudosten kuljetuksessa

käytettävät liuokset pääsevät kiertämään kudospalan ympärillä kasetin sisällä. (Rolls 2011; Mäkinen 2012b; Suvarna & Layton 2013; Rantala 2014.)

## 2.5 Kudosprosessointi

Esikäsittelyn jälkeen näytteet laitetaan kaseteissaan automatisoituihin kudosprosessoreihin, joissa tapahtuvan prosessoinnin tarkoituksena on kovettaa kudospätkiä juuri sopivasti niin, että niiden leikkaaminen mikrotomilla on mahdollista (Mäkinen 2012b). Kudosprosessoinnissa näytteet käyvät läpi kolme vaihetta, jotka yhteensä voivat kestää joillakin näytteillä lyhimmillään muutaman tunnin ja joillakin näytteillä taas pisimmillään useamman päivän. (Spencer & Bancroft 2013.)

Prosessoinnin ensimmäinen vaihe on dehydraatio, jossa kudoksista poistetaan sitoutumaton vesi ja vesiliukoinen fiksaatiivi nousevalla alkoholisarjalla, johon voidaan käyttää esimerkiksi isopropanolia, etanolia tai denaturoituja alkoholeja. Toisena vaiheena on kirkastus, jossa dehydraatiossa käytetty liuos poistetaan kudoksista, jotta ne saadaan vastaanottamaan seuraavassa vaiheessa etanolin kanssa liukenematon infiltatioaine. Yleisin kirkastukseen käytetty aine on ksyleeni (Alwahaibi ym. 2018). Kudosprosessoinnin lopuksi kudoksiin imeytetään infiltatioaine, yleisimmin parafiini, joka imeytyy sulana kudoksiin ja jähmettyessään tukee ja kovettaa kudoksia helpottaen niiden leikkaamista mikrotomilla. (Spencer & Bancroft 2013.)

Kudosprosessoreihin on mahdollista ohjelmoida erilaisia ohjelmia erityyppisiä ja eri kokoisia näytteitä varten. Ohjelmat voidaan ajastaa alkamaan tietynä ajankohtana, minkä lisäksi ohjelmissa voidaan tarpeen mukaan muuttaa liuoksia, liuosaikoja, liuosten lämpötiloja sekä vakuumia, jotka kaikki vaikuttavat omalla tavallaan kudosprosessoinnin tehokkuuteen ja onnistumiseen (Jali ym. 2015). Liuosten lämpötilaa nostamalla esimerkiksi mikroalloilla liuokset saadaan kulkeutumaan nopeammin kudosten läpi. Lämpötila ei saa nousta liian korkeaksi, sillä yli 45 °C:ssa kudokset saattavat kutistua ja haurastua, mikä taas hankaloittaa sen leikkaamista. Lisäksi kudoksen värjäytyminen saattaa olla tällöin heikkoa. (Spencer & Bancroft 2013; Shrestha ym. 2015.)

Kudoksen rakenteen säilyvyyteen vaikuttaa liuosten lämpötilojen lisäksi myös aika, jonka kudokset altistuvat liuoksille (Shrestha ym. 2015). Riittävän hitaasti tehty ja sopivan pituinen dehydraatiovaihe on tärkeää, jotta kudoksen rakenne säilyisi mahdollisimman

hyvänä. Liiallinen dehydraatio saattaa tehdä kudoksesta kovaa, kutistunutta ja haurasta, kun taas puutteellinen dehydraatio estää prosessoinnin seuraavassa vaiheessa kirkastusaineen imeytymisen kudokseen jättäen sen pehmeäksi. Myös liian pitkä aika kirkastusaineessa aiheuttaa kudoksen kutistumista ja haurastumista. (Aho 1999; Spencer & Bancroft 2013.)

Kudosprosessoinnin tehokkuuteen ja onnistumiseen vaikuttaa myös prosessoinnin aikainen agitaatio. Sopiva agitaatio edistää liuosten vaihtumista kudosten sisällä ja ympärillä, jolloin kudosten prosessointi nopeutuu. Liian raju agitaatio saattaa vaurioittaa pienimpiä kudospaloja, kun taas liian hidas agitaatio on vain tehotonta. Myös vakuumi eli alipaine parantaa niin ikään liuosten siirtymistä kudoksiin kaikissa kudosprosessoinnin vaiheissa. Vakuumi parantaa erityisesti parafiinin imeytymistä rasvakudokseen. (Spencer & Bancroft 2013.)

## 2.6 Parafiinivalu

Kuduskuljetuksen jälkeen kudospalat valetaan parafiiniin, jonka tarkoitus on tukea näyttettä ulkoisesti mikrotomilla tehtävässä leikkausvaiheessa. Yleensä valaminen tapahtuu siihen tarkoitettuun valukeskukseen, jossa kudospala siirretään kasetistaan lämpölevyn päällä olevaan sulaa parafiinia sisältävään muottiin. Palat asetetaan muottiin oikeaan asentoon, leikkauspinta alaspäin ja mahdollisimman tasaisesti muotin pohjaa vasten. Muotin kanneksi asetetaan näytteen identifiointitiedot sisältävä kudokasetti, muotti täytetään parafiinilla ja siirretään kylmälevylle kovettumaan. Kun parafiini on jähmettynyt, yleensä noin 5 minuutin jälkeen, valmis ”parafiiniblokki” irrotetaan muotista ja on valmis seuraavaa vaihetta eli mikrotomia varten. (Aho 1999; Rolls 2011; Spencer & Bancroft 2013; Rantala 2014.)

## 2.7 Mikrotomia

Seuraavaksi valmiista parafiiniblokeista leikataan ohuen ohuita leikkeitä mikrotomin avulla. Eri tarkoituksiin on kehitetty hieman erilaisia mikrotomeja, joista yleisimmin laboratorioissa käytössä on rotaatiomikrotomi. Siinä mikrotomin pidikkeeseen kiinnitetty

parafiiniblokki liikkuu käsikampea pyörittämällä vertikaalisesti. Jokaisella käsikammen pyöräytyksellä blokki liikkuu kohti paikallaan pysyvää teräsveistä ennalta säädetyn etäisyyden verran, joka on sama kuin muodostuvan leikkeen paksuus. (Mohammed ym. 2012; Spencer & Bancroft 2013; Dey 2018c.)

Ensimmäiseksi kylmälevyllä viilennetystä blokista ”trimmataa” ylimääräistä parafiinia pois, kunnes kudokset tulevat kokonaan näkyviin (Abcam; Rolls 2010). Näytteeksi otetaan usealta eri tasolta riittävä määrä leikkeitä, joiden paksuus vaihtelee 2 mikrometrillä 10 mikrometriin riippuen kudoksesta ja sille tehtävästä värjäyksestä. Yleisimmin käytetään 3-5 mikrometrin leikepaksuutta, jolloin leikkeessä on soluja ainoastaan yhdessä kerroksessa. Onnistuneet leikkeet siirretään lämpimän veden pinnalle altaaseen, josta ne poimitaan tunnistetiedoin varustetulle objektilasille samansuuntaisesti. Leikkeet kiinnitetään lasille lämmön avulla joko lämpökaapissa tai lämpölevyllä. Hyvä leike on tasaisen ohut, ehjä ja rypytön. Leikkeessä ei saa olla vierasmateriaalia, kudoksen laajenemista tai naarmuja, eikä se saa irtoilla lasilta. (Naukkarinen 1998; Rolls 2011; Rantala 2014; Nummela 2017.)

## 2.8 Värjääminen

Värjäämisen tarkoituksena on saada kudokset näkyviin esimerkiksi eri solutyyppejä, kudoserakenteita ja mikro-organismeja (Anderson 2012). Ennen värjäystä kudokset poistetaan parafiini liuottimella, yleensä ksyleenillä, minkä jälkeen leikkeet rehydroidaan eli niihin palautetaan vesi laskevalla alkoholisarjalla. Värjäyksen päätteeksi vesi poistetaan jälleen nousevalla alkoholisarjalla, ja lopuksi leikkeet kirkastetaan ksyleenillä. Tämän jälkeen leikkeiden päälle kiinnitetään peitinlasi päällystysaineen avulla. (Aho 1999; University of Leeds 2003; Rantala 2014; Pandey ym. 2014; Alwahaibi ym. 2018.)

Suomessa yleisin histologinen perusvärjäys on hematoksyliini-eosiini (HE) -värjäys, joka sisältää kahta väriainetta, hematoksyliiniä ja eosiniä (Mäkinen 2012b; Rantala 2014). Hematoksyliini värjää emäksisenä väriaineena kudosten happamat rakenteet, kuten tummat, sinisen ja violetin sävyillä, ja eosini värjää happamana väriaineena emäksiset rakenteet, kuten kollageenisäikeet, punasolut ja lihassäikeet, punaisen eri sävyillä (Anderson 2012; Azevedo Tosta ym. 2017).

Toinen patologian laboratorioissa käytössä oleva yleisvärjäys on Weigert van Gieson -värjäys, joka sisältää tumat värjäävää Weigertin hematoksyliiniä sekä van Gieson -liuosta, joka koostuu pikriinihaposta ja happamasta fuksiinista. Pikriinihappo värjää soluliiman, punasolut, lihaksen ja fibriinin kellertäväksi ja fuksiini sidekudoksen kollageenin punaiseksi. (Aho 1999.)

Perusvärjäysten lisäksi näytteiden värjäämiseen voidaan käyttää tarvittaessa erilaisia erikoisvärjäyksiä, joilla voidaan varmistaa perusvärjäyksissä havaitut löydökset tai saada näkyviin tiettyjä kudskomponentteja, jotka näkyvät huonosti perusvärjäyksillä. Erikoisvärjäyksiä käytetään muun muassa munuais-, maksa- ja luuydinbiopsioiden diagnostiikassa. Yleisimpiä erikoisvärjäyksiä ovat muun muassa lima-aineita ja glykogeenia värjäävä PAS-värjäys, lima-aineita värjäävä Alcian Blue-värjäys ja helikobakteereja värjäävä modifioitu Giemsa-värjäys. (Anderson 2012; Mäkinen 2012b.)

### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli prosessoida erikokoisia rinta- ja kohtukudosnäytteitä kahdella eri kudosprosessointiohjelmalla, joista ohjelma 1 on PHKS:n patologian laboratoriossa nykyisin käytössä oleva noin kolme vuorokautta kestävä ohjelma ja ohjelma 2 on noin kahden vuorokauden mittaiseksi lyhennetty ohjelma. Vertailemalla prosessointiohjelmien vaikutusta näytteiden leikkautumiseen, värjäytymiseen ja morfologiaan pyrittiin selvittämään, soveltuuko lyhyempi ohjelma erikokoisten rasvakudosta sisältävien sekä rakenteeltaan tiiviimpien näytteiden prosessoimiseen. Tavoitteena oli, että PHKS:n patologian laboratoriossa pystyttäisiin prosessoimaan erikokoisia rasvaisia kudospäytteitä sekä erilaisia makrokokoisia näytteitä kolme kertaa viikossa, kun tällä hetkellä prosessointi pystytään tekemään ainoastaan kahdesti viikossa. Kun kudospäytteiden prosessointiin kuluisi vähemmän aikaa, patologi pääsisi aiemmin tekemään näytteistä diagnooseja, mikä taas nopeuttaisi potilaan hoidon saantia.

## 4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

### 4.1 Opinnäytetyön käytännön toteutus

Opinnäytetyön aihe saatiin PHKS:n patologian laboratoriolta syksyllä 2017, jolloin myös aloitettiin opinnäytetyön suunnitelman laatiminen. Huhtikuussa 2018 opinnäytetyölle haettiin tutkimuslupaa Päijät-Hämeen hyvinvointikuntayhtymään kuuluvalta Päijät-Hämeen laboratorioliketalokselta sekä tehtiin patologian laboratorion kanssa toimeksiantosopimus. Varsinainen tutkimustyö tehtiin tutkimusluvan saamisen jälkeen toukokuussa 2018 PHKS:n patologian osastolla, josta saatiin myös kaikki tarvittavat potilasnäytteet ja väliaineet.

Kudosnäytteet kerättiin tutkimusta varten neljästä rinnasta ja neljästä kohdusta, joiden fiksaatioajat vaihtelivat viikosta kuukauteen. Kaikista näytteistä oli jo annettu diagnostiset lausunnot. Jokaisesta neljästä rinnasta otettiin kahdesta kohdasta kaksi keskenään mahdollisimman samankaltaista rinnakkaista palaa, jotka leikattiin 1,5 x 2,0 x 0,4 cm kokoisiksi. Palat laitettiin tunnistetiedoin varustettuihin ”normaalikokoisiin” kudoskasetteihin, joiden sisämitat olivat 2,6 x 3,2 x 0,5 cm. Lisäksi jokaisesta rinnasta otettiin kaksi rinnakkaista 3 x 4 x 0,6 cm kokoista palaa, jotka laitettiin 4,8 x 6,4 x 1,5 cm kokoisiin ”makrokasetteihin”. Rinnoista kerättiin siis yhteensä 24 kudospalaa, joista normaalikokoisia paloja oli 16 ja makrokokoisia 8. Näytepaloille annettiin juoksevat numerot 1–12 niin, että rinnakkaiset palat saivat saman numeron, ja toinen paloista oli A-pala ja toinen B-pala. Makrokokoisia näytteitä olivat näytepalat 3, 6, 9 ja 12.

Jokaisesta neljästä kohdusta otettiin kahdesta kohdasta kaksi 1,5 x 2,0 x 0,4 cm kokoista palaa. Kaikki palat laitettiin omiin tunnistetiedoin varustettuihin kudoskasetteihinsä, jotka olivat niin ikään 2,6 x 3,2 x 0,5 cm kokoisia. Kohduista kerättiin siis yhteensä 16 samankokoista kudospalaa. Kudoskasetit merkittiin numeroilla 1–8 ja kirjaimilla A ja B samaan tapaan kuin rintänäytteet.

Kaikki A-palat eli kaikkiaan 12 rintänäytettä ja 8 kohtunäytettä prosessoitiin patologian laboratoriossa nykyisin käytössä olevalla kudosprosessointiohjelmalla (ohjelma 1) (Liite 1), jonka todellinen pituus on 55 h 44 min. Rinnakkaiset palat eli B-palat prosessoitiin testiohjelmalla (ohjelma 2) (Liite 1), jonka eri vaiheiden kestoja lyhennettiin niin, että ohjelman kokonaiskestoksi saatiin 41 h 24 min. Muut asetukset olivat molemmissa

ohjelmissa samanlaisia. Kaikkien näytteiden prosessointiin käytettiin Thermo Fisher Scientific Excelsior -kudosprosessoria.

Ohjelman valmistumisen jälkeen näytteet poistettiin prosessorista: Ohjelmassa 1 olleet näytteet poistettiin kolmen päivän kuluttua ja ohjelmassa 2 olleet näytteet kahden päivän kuluttua prosessorin käynnistämisestä. Näytepalat valettiin seuraavaksi parafiiniin, minkä jälkeen jokaisesta parafiiniblokista leikattiin mikrotomilla yksi 4 mikrometrin paksuinen leike omalle objektilasillensa. Näytteiden leikkautumista arvioitiin leikkaamisen yhteydessä asteikolla 0–3 (0 = Näyte ei leikkautunut lainkaan, 1 = Näyte leikkautui huonosti, 2 = Näyte leikkautui kohtalaisesti ja 3 = Näyte leikkautui hyvin). Leikkeiden annettiin kiinnittyä objektilaseille lämpölevyllä noin 15 minuuttia. Kaikki objektilaseilla olevat leikkeet värjättiin HE-värjäyksellä värjäysautomaatissa ja päällystettiin peitinlaseilla. Lopuksi näytteiden kudismorfologiaa ja värjäytymistä tarkasteltiin valomikroskoopilla solubiologin kanssa. Kudismorfologia arvioitiin asteikolla 0–3 (0 = Näytteen kudismorfologia ei säilynyt lainkaan, 1 = Näytteen kudismorfologia oli huono, 2 = Näytteen kudismorfologia oli kohtalainen ja 3 = Näytteen kudismorfologia oli hyvä). Värjäytymistä arvioitiin niin ikään asteikolla 0–3 (0 = Näyte ei värjäytynyt lainkaan, 1 = Näyte värjäytyi huonosti, 2 = Näyte värjäytyi kohtalaisesti ja 3 = Näyte värjäytyi hyvin).

Tutkimuksen tuloksena saatu havaintoaineisto analysoitiin tilastollisesti Microsoft Excelin avulla. Opinnäytetyön raportti kirjoitettiin vuoden 2018 kesän ja syksyn aikana. Raporttiin etsittiin teoriaperustaa varten mahdollisimman tuoreita lähteitä eri tietokannoista. Valmis työ esitettiin Turun ammattikorkeakoululla sekä PHKS:n patologian laboratoriossa marraskuussa 2018.

#### 4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivinen eli määrällinen menetelmä on tutkimustapa, jossa muuttujien eli mitattavien tekijöiden välisiä suhteita ja ominaisuuksia käsitellään yleisesti kuvaillen numeroiden avulla. Määrällisessä tutkimuksessa tutkimustieto siis saadaan numeroina tai laadullinen aineisto ryhmitellään numeeriseen muotoon, tulokset esitetään esimerkiksi tunnuslukuina ja lopulta numerotieto tulkitaan sanallisesti. Määrällinen tutkimus vastaa kysymyksiin kuinka paljon, kuinka moni ja kuinka usein. Tutkimusmenetelmään kuuluu myös, että tutkittava asia strukturoidaan eli tutkittava asia ja sen ominaisuudet

suunnitellaan ja vakioidaan ennen aineiston keräämistä. Jokaiselle muuttujalle annetaan arvo, joka voidaan ilmaista symboleina, kuten numeroina tai kirjaimina. (Vilkka 2007.)

Tutkimuksellisessa opinnäytetyössä keskeisenä toimijana on opiskelija, jonka työn tuloksena syntyy uutta tietoa rajatusta tutkimuskysymyksestä yleensä tutkimusraportin muodossa. Uusi tieto pohjautuu aiheeseen liittyvään teoriaperustaan, käsitteisiin sekä niiden määrittelyyn. Tutkimuksellisen työn yhtenä tunnuspiirteenä voidaan myös pitää sitä, että työote on tutkimusorientoitunut eli työskentely on tutkimussuunnitelman mukaista. Lisäksi oleellisia asioita ovat tutkimuksen objektiivisuus, läpinäkyvyys sekä luotettavuus. (Salonen 2013.)

Tämä oli tutkimuksellinen kvantitatiivinen opinnäytetyö, jossa vertailtiin kahdella eripituisella kudosprosessointiohjelmalla saatuja tuloksia keskenään. Opinnäytetyö suunniteltiin aiheeseen liittyvän teoriaperustan avulla, ja työ toteutettiin suunnitelman mukaisesti. Tutkimustyö tehtiin mahdollisimman objektiivisesti, luotettavasti ja läpinäkyvästi. Tutkittavia asioita eli muuttujia olivat näytteiden leikkautuminen, näytteiden värjäytyminen sekä näytteiden kudismorfologia. Muuttujista muodostettiin mittarit niin, että niille annettiin symboliset numeroarvot, ja vastausvaihtoehdot vakioitiin näytteiden arvioinnissa. Havainnoinnin avulla saatu numeerinen tutkimustieto analysoitiin tilastollisilla menetelmillä sekä tulkittiin ja selitettiin sanallisesti. Tutkimuksen tuloksena syntyi uutta tietoa siitä, onko pidemmän ja lyhyemmän prosessointiohjelman välillä eroa rinta- ja kohtunäytteiden leikkautumisessa, värjäytymisessä tai kudismorfologiassa.

#### 4.3 Opinnäytetyön eettisyys

Tieteellisessä tutkimuksessa on noudatettava hyvää tieteellistä käytäntöä, jotta sitä voidaan pitää eettisesti hyväksyttävänä ja luotettavana sekä sen tuloksia uskottavina. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu, että tutkimuksessa sovelletaan eettisesti kestäviä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä. Lisäksi noudatetaan huolellisuutta, rehellisyyttä ja tarkkuutta tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa ja esittämisessä sekä tutkimusten ja niiden tulosten arvioinnissa. Tutkimuksen suunnittelu, toteutus ja raportointi on tehtävä yksityiskohtaisesti ja tieteelliselle tiedolle asetettujen vaatimusten edellyttämällä tavalla. Hyvän tieteellisen käytännön mukaista on myös tarvittavien

tutkimuslupien hankkiminen ennen tutkimuksen toteuttamista. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta; Launis 2007; Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013.)

Tutkijan saamien tulosten luotettavuutta heikentää hyvän tieteellisen käytännön loukkaus epäeettisellä ja epärehellisellä toiminnalla. Hyvän tieteellisen käytännön loukkaukset jaotellaan piittaamattomuuteen hyvästä tieteellisestä käytännöstä sekä tutkimusvilppiin, johon kuuluvat havaintojen vääristely, plagiointi, sepittäminen ja anastaminen. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta; Launis 2007.)

Tämän opinnäytetyön kaikissa vaiheissa noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Hyvää tieteellistä käytäntöä ei myöskään loukattu minkäänlaisella tutkimusvilpillä tai piittaamattomuudella hyvästä tieteellisestä käytännöstä. Työssä käytettyjä lähteitä ei plagioitu tai anastettu, vaan lähteistä poimittu tieto kerrottiin omin sanoin, ja kaikki käytetyt lähteet merkittiin asianmukaisesti tekstiin. Kaikissa työvaiheissa ja kaikkien näytteiden kanssa toimittiin huolellisesti ja mahdollisimman samalla tavalla, jotta eri työvaiheista johtuva vaihtelu olisi mahdollisimman pientä, eikä vaikuttaisi tuloksiin.

Opinnäytetyön aiheen lähtökohtana oli sen hyödyllisyys ja ajankohtaisuus PHKS:n patologian laboratoriolle, jonka laatupolitiikkaan kuuluu toiminnan jatkuva parantaminen ja kehittäminen (Paukku-Sani ym. 2018). Työstä saatu hyöty ei kohdistunut potilaisiin, joiden näytteitä työssä käytettiin, mutta jatkossa potilaat voivat hyötyä näytteiden nopeammasta käsittelystä. Tutkimuksen tekemiseen hankittiin tarvittavat ja asianmukaiset tutkimusluvut Päijät-Hämeen laboratoriolaitokselta, johon PHKS:n patologian laboratorio kuuluu. Opinnäytetyö suunniteltiin huolellisesti, ja suunnitelmaa myös noudatettiin käytännössä tarkasti.

Kaikki tulokset ja havainnot käsiteltiin ja esitettiin rehellisesti ja tarkasti ilman sepittämistä tai vääristelyä. Tietosuojan toteutuminen otettiin tutkimusta tehdessä huomioon antamalla käytetyille potilasnäytteille juoksevat numerot niin, että työn tekijä ei missään vaiheessa saanut tietää näytteisiin liittyviä potilastietoja. Kaikki tutkimusmateriaali hävitettiin oikeaoppisesti viimeistään opinnäytetyön valmistuttua.

## 5 TUTKIMUSTULOKSET

### 5.1 Näytteiden leikkautuminen

Ohjelmassa 1 olleista 12 rintanäytteestä 10 näytettä (83 %) leikkautui mikrotomilla hyvin (Taulukko 1). Kahden näytteen arvioitiin leikkautuvan kohtalaisesti. Molemmat näistä rintanäytteistä olivat makrokokoisia näytteitä. Kaikkien ohjelman 1 rintanäytteiden leikkautumisen keskiarvo oli noin 2,8.

Ohjelman 2 rintanäytteistä hyvin leikkautui 11 näytettä (92 %) ja kohtalaisesti yksi makrokoinen näyte (8 %) (Taulukko 1). Kaikkien ohjelmassa 2 olleiden rintanäytteiden leikkautumisen keskiarvoksi saatiin noin 2,9. Rintanäytteiden leikkautumisesta annetut pisteet on eritelty näytteittäin liitteessä 2.

Taulukko 1. Rintanäytteiden leikkautumiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).

Pisteet	Ohjelma 1 f (f %)	Ohjelma 2 f (f %)
0	0	0
1	0	0
2	2 (17 %)	1 (8 %)
3	10 (83 %)	11 (92 %)

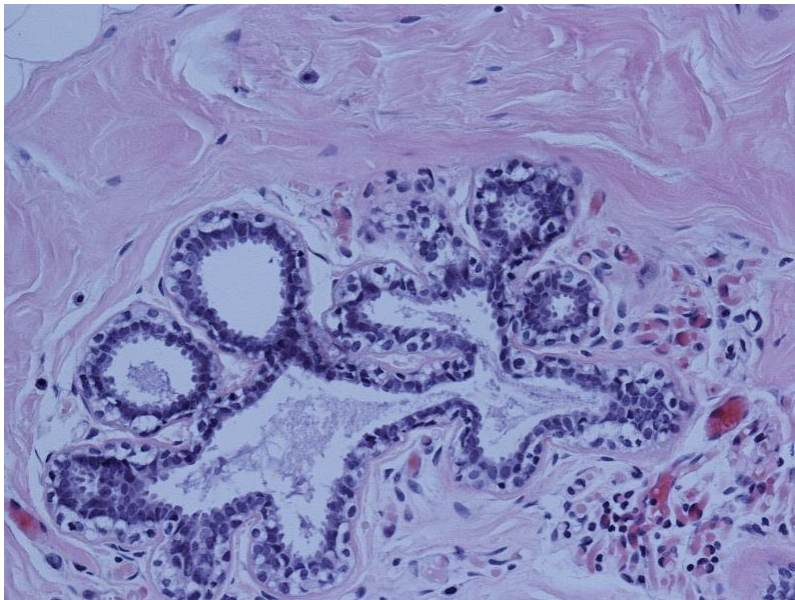
Kaikki ohjelmassa 1 sekä ohjelmassa 2 olleet yhteensä 16 kohtunäytteestä (100 %) leikkautui hyvin (Taulukko 2). Kohtunäytteiden leikkautumisesta annetut pisteet on eritelty näytteittäin liitteessä 3.

Taulukko 2. Kohtunäytteiden leikkautumiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).

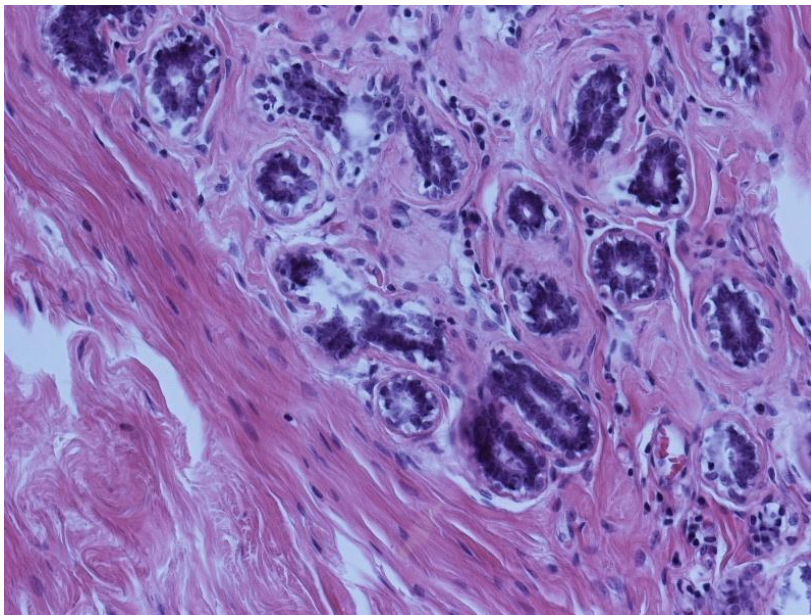
Pisteet	Ohjelma 1 f (f %)	Ohjelma 2 f (f %)
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	8 (100 %)	8 (100 %)

## 5.2 Näytteiden värjäytyminen

Ohjelman 1 rintänäytteistä 10 näytettä (83 %) värjäytyi hyvin ja 2 näytettä (17 %) kohtalaisesti (Taulukko 3). Kohtalaisesti värjäytyneet näytteet olivat normaalikokoisia näytteitä. Kaikkien ohjelmassa 1 olleiden rintänäytteiden värjäytyvyyden keskiarvoksi saatiin noin 2,8. Kuvassa 1 on ohjelmassa 1 ollut rintänäyte, joka värjäytyi hyvin, ja kuvassa 2 on saman ohjelma kohtalaisesti värjäytynyt rintänäyte.



Kuva 1. Hyvin värjäytynyt rintänäyte (20x), ohjelma 1.

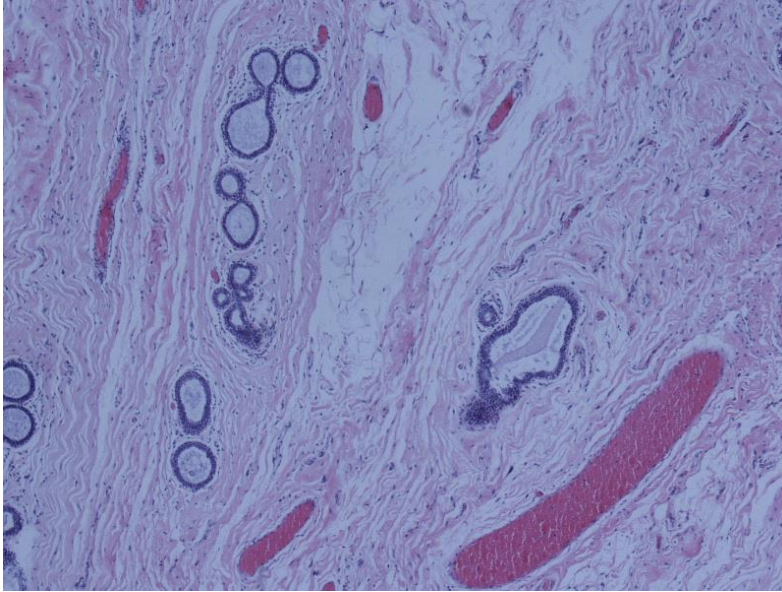


Kuva 2. Kohtalaisesti värjäytynyt rintänäyte (20x), ohjelma 1.

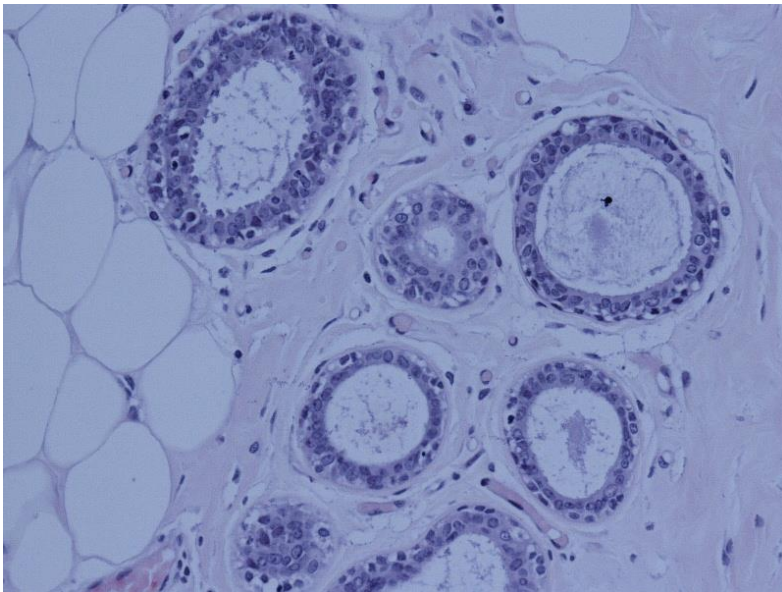
Ohjelmassa 2 olleista rintänäytteistä 5 (42 %) värjäytyi hyvin ja 7 (58 %) kohtalaisesti (Taulukko 3). Myös tässä tapauksessa kohtalaisesti värjäytyneet olivat normaalikokoisia näytteitä. Kaikkien ohjelmassa 2 olleiden rintänäytteiden värjäytyvyyden keskiarvoksi saatiin noin 2,4. Kuvassa 3 on ohjelmassa 2 ollut rintänäyte, joka värjäytyi hyvin, ja kuvassa 4 on saman ohjelman kohtalaisesti värjäytynyt rintänäyte. Rintänäytteiden värjäytymisestä annetut pisteet on eritelty näytteittäin liitteessä 2.

Taulukko 3. Rintänäytteiden värjäytymiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).

Pisteet	Ohjelma 1 f (f %)	Ohjelma 2 f (f %)
0	0	0
1	0	0
2	2 (17 %)	7 (58 %)
3	10 (83 %)	5 (42 %)

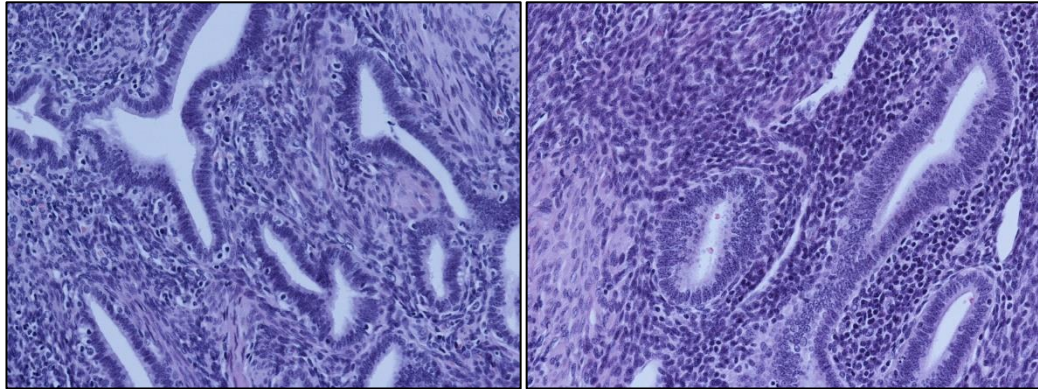


Kuva 3. Hyvin värjäytynyt rintänäyte (10x), ohjelma 2.



Kuva 4. Kohtalaisesti värjäytynyt rintänäyte (20x), ohjelma 2.

Kaikki ohjelmassa 1 ja 2 olleet kohtunäytteet värjäytyivät hyvin (Taulukko 4). Kuvassa 5 on kaksi hyvin värjäytynyttä kohtunäytettä, vasemmalla puolella oleva näyte oli ohjelmassa 1 ja oikealla puolella oleva näyte oli ohjelmassa 2. Kohtunäytteiden värjäytymisestä annetut pisteet on eritelty näytteittäin liitteessä 3.



Kuva 5. Vasen: Kohtunäyte (20x), ohjelma 1. Oikea: Kohtunäyte (20x), ohjelma 2.

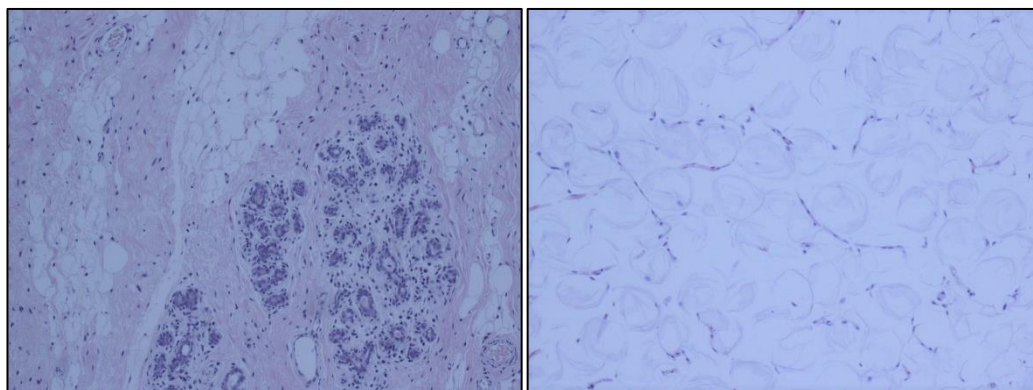
Taulukko 4. Kohtunäytteiden värjäytymiselle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).

Pisteet	Ohjelma 1 f (f %)	Ohjelma 2 f (f %)
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	8 (100 %)	8 (100 %)

### 5.3 Näytteiden kudismorfologia

Kaikissa 12 rintänäytteessä, jotka olivat ohjelmassa 1, kudismorfologia oli hyvää (Taulukko 5). Sen sijaan ohjelmassa 2 olleista rintänäytteistä 10 näytteessä (83 %) morfologia

oli säilynyt hyvänä, ja kahdessa normaalikokoisessa näytteessä (17 %) morfologia oli kohtalaista. Näin ollen ohjelman 2 näytteille kudostamorfologian keskiarvoksi saatiin noin 2,8. Kuvassa 6 on kaksi ohjelmassa 2 ollutta rintänäytettä, joissa kudostamorfologia oli kohtalaista. Rintänäytteiden kudostamorfologiasta annetut pisteet on eritelty näytteittäin liitteessä 2.



Kuva 6. Vasen: Rintänäyte (10x), ohjelma 2. Oikea: Rintänäyte (20x), ohjelma 2.

Taulukko 5. Rintänäytteiden kudostamorfologialle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).

Pisteet	Ohjelma 1 f (f %)	Ohjelma 2 f (f %)
0	0	0
1	0	0
2	0	2 (17 %)
3	12 (100 %)	10 (83 %)

Kaikissa ohjelman 1 ja ohjelman 2 kohtunäytteissä kudostamorfologia arvioitiin hyväksi (Taulukko 6). Kohtunäytteiden kudostamorfologiasta annetut pisteet on eritelty näytteittäin liitteessä 3.

Taulukko 6. Kohtunäytteiden kudusmorfologialle annettujen pisteiden frekvenssit (f) ja suhteelliset frekvenssit (f %).

<b>Pisteet</b>	<b>Ohjelma 1 f (f %)</b>	<b>Ohjelma 2 f (f %)</b>
<b>0</b>	0	0
<b>1</b>	0	0
<b>2</b>	0	0
<b>3</b>	8 (100 %)	8 (100 %)

## 6 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli prosessoida rinnakkaisia rinta- ja kohtukudospaloja kahdella eripituisella ohjelmalla PHKS:n patologian laboratoriossa. Vertailemalla prosessointiohjelmien vaikutusta näytteiden leikkautumiseen, värjäytymiseen ja morfologiaan pyrittiin selvittämään, soveltuuko lyhyempi ohjelma erikokoisten rasvakudosta sisältävien sekä rakenteeltaan tiiviimpien näytteiden prosessoimiseen. Opinnäytetyön tavoitteena oli, että kyseiset kudoksenäytteet saataisiin prosessoitua laboratoriossa kolmen päivän sijaan kahdessa päivässä. Tällöin yhden työviikon aikana ehdittäisiin prosessoimaan näytteitä kolme kertaa, kun tähän asti niitä on ehditty prosessoimaan kaksi kertaa viikossa. Näytteiden nopeampi prosessointi nopeuttaisi lopulta myös potilaan hoitoa.

PHKS:n patologian laboratoriolle on tehty opinnäytetyö samankaltaisesta aiheesta jo vuonna 2007. Heinrichs (2007) selvitti tuolloin työssään, onko rasvakudosta sisältävien näytteiden leikkautumisessa eroa, kun ne prosessoidaan 11 tuntia kestäväällä ohjelmalla ja kun ne prosessoidaan kolme päivää kestäväällä ohjelmalla. Tutkimuksen tuloksena rasvaisille kudoksille otettiin tuolloin käyttöön kolmen päivän ohjelma, jolla prosessoitujen näytteiden todettiin leikkautuvan mikrotomilla paremmin. Nyt laboratoriossa on kuitenkin koettu kyseinen kolmen vuorokauden ohjelma hieman liian pitkäksi, ja laboratorion ehdotuksesta nyt selvitettiin, onko ohjelma mahdollista lyhentää kahden vuorokauden mittaiseksi.

Tutkimuksen kohteena olevalla prosessointiohjelmalla prosessoidaan normaalisti rintänäytteiden lisäksi myös muita rasvakudosta sisältäviä sekä mitä tahansa makrokokoisia kudoksenäytteitä, esimerkiksi eturauhasnäytteitä. Tässä työssä käytettiin niin ikään tutkimusmateriaalina rintakudoksenäytteitä normaalikokoisina ja makrokokoisina paloina, sillä haluttiin selvittää, onko prosessoitumisessa eroa erikokoisten näytteiden välillä. Rintakudos valikoitui tutkimusmateriaaliksi myös siksi, että sen saatavuus työtä varten oli hyvä, koska se on laboratoriossa melko yleinen kudoksenäyte, jota jää lähes aina yli diagnostiikkaa varten otettavien näytepalojen ottamisen jälkeen.

Toiseksi kudokseksi työhön valittiin kohtukudosta, jonka kaltaista tiiviimpää kudostyyppiä ohjelmassa halutaan myös prosessoida. Yleisimpiä tällaisia näytteitä patologian laboratoriossa ovat eturauhasnäytteet, mutta koska niitä ei ollut käytettävissä tätä työtä varten, valittiin saatavuudeltaan parempaa kohtukudosta. Kohtukudoksenäytteet prosessoidaan

patologian laboratoriossa normaalisti toisella prosessointiohjelmalla, jonka kesto on huomattavasti lyhyempi kuin tämän tutkimuksen ohjelma 2.

Työhön haluttiin siis valita kaksi rakenteeltaan toisistaan poikkeavaa kudostyyppiä, jotka tarvitsevat prosessoituaikseen melko eri pituiset ohjelmat. Näille erityyppisille kudoksille pyrittiin löytämään kompromissina sen pituinen prosessointiohjelma, jossa molemmat kudokset prosessoituvat mahdollisimman hyvin. Rasvainen rintakudos tarvitsee melko pitkän prosessointiajan, jotta kudoksesta poistuu sen sisältämä vesi, kun taas kohtukudos ei saa olla liian pitkiä aikoja etenkin ohjelman alkoholihuuhteluissa, jottei se kuivu liikaa. Tämän perusteella prosessointiohjelman lähes jokaisen vaiheen pituutta lyhennettiin solubiologin arvion mukaan niin, että sen kokonaiskestoksi tuli 41 h 24 min.

Tämän työn ainoat näytteet, joissa leikkautuminen mikrotomilla arvioitiin kohtalaiseksi, olivat makrokokoisia rintänäytteitä, joista kaksi oli prosessoitu ohjelmassa 1 ja yksi ohjelmassa 2. Leikkautuminen arvioitiin kohtalaiseksi, koska leikkeisiin tuli halkeamia leikkaamisen yhteydessä. Kaiken kaikkiaan kohtalaisesti leikkautuvien näytteiden osuus kaikista näytteistä oli niin pieni, että halkeamien muodostumista ei pidetty merkittävänä asiana. Makrokokoisten näytteiden leikkaaminen mikrotomilla on yleensäkin haastavampaa kuin normaalikokoisten näytteiden leikkaaminen, ja halkeamia saattaa muodostua myös pidempään prosessoituja näytteitä leikatessa. Tässä tutkimuksessa näytteet siis leikkautuivat pääasiassa hyvin, eikä lyhyempi prosessointiohjelma näyttänyt huonontavan normaali- tai makrokokoisten näytteiden leikkautumista.

Ohjelmassa 2 olleista rintänäytteistä kahdessa oli ongelmana, että eosiniiväri ei ollut tarttunut kudoksen rakenteisiin niin hyvin kuin olisi pitänyt. Muun muassa punasolut ja sidekudoksen säikeet olivat siis värjäytyneet eosiinilla vain heikosti punertaviksi (Kuva 4). Viidessä rintänäytteessä värjäytyminen arvioitiin yleisellä tasolla kohtalaiseksi. Kuten Dey (2018b) kertoo teoksessaan, puutteet värjäytymisessä saattavat osittain johtua siitä, että leikkeet ovat mahdollisesti olleet hieman ohuita. Lisäksi osa värjäytymisen puutteista voidaan laskea normaaliksi vaihteluksi, jota kudosten värjäytymisessä aina hieman esiintyy, mikä mainitaan myös Niethammerin ym. (2010) artikkelissa.

Kahden rintänäytteen leikkeet olivat muihin leikkeisiin nähden niin paksuja, että ne olivat ylivärjäytyneitä, ja niiden morfologiaa oli hankala tulkita. Näitä näytteitä ei myöskään oikein pystytty luotettavasti vertaamaan rinnakkaisiin, selkeästi ohuempiin näytteisiin, mistä johtuen kyseisten näytteiden värjäytyminen arvioitiin kohtalaiseksi. Kyseiset näytteet olivat ohjelmassa 1 olleista rintänäytteistä ainoita, joiden värjäytyminen oli

kohtalaista. Spencer ja Bancroft (2013) kertovat, että liian paksun leikkeen syynä voi olla kulunut mikrotomin veitsi tai se, että näyteblokki ei ole ollut leikattaessa riittävän kylmä.

Ohjelmassa 1 olleissa rintanäytteissä myös kudost morfologia säilyi hieman paremmin kuin ohjelman 2 rintanäytteissä. Kahdessa lyhyemmän ohjelman näytteessä kudost morfologia oli kohtalaista, koska niissä rasvasolujen morfologia oli epänormaalin näköistä, solut olivat kutistuneita ja irti toisistaan. Koska tällaisia näytteitä oli vain kaksi, tulosta ei voida pitää kovin merkittävänä, eikä todennäköisesti lyhyemmästä prosessoinnista johtuvana. Kyseisten rintanäytteiden morfologia saattoi huonontua mikrotomia-vaiheessa tai jo jossain aiemmassa vaiheessa, sillä molemmat näytteet olivat saman potilaan rinnasta.

Asia, joka hyvin todennäköisesti vaikutti tämän tutkimustyön lopputuloksiin, oli se, että kudostnäytteet ehtivät fiksoitua formaliinissa vähintään viikon ja osa jopa kuukauden ajan. Normaalisti PHKS:n patologian laboratorion näytteet fiksoituvat enintään viikon ajan. Hyvä fiksointi vaikutti tässä tapauksessa mahdollisesti ainakin morfologian säilymiseen sekä kudosten hyvään leikkautuvuuteen.

Tässä työssä kaikkien kudospalojen koot vakioitiin mahdollisimman samankokoisiksi, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia keskenään. Lisäksi näytepalat leikattiin kudostkasetteihin sopiviksi niin, että niiden ympärille kasetin sisälle jäi reilusti tilaa. Näin toimimalla varmistettiin se, että prosessoinnin aikana liuokset pääsivät kunnolla kulkemaan näytteiden ympärillä, jolloin kudokset prosessoituivat täysin. Todellisuudessa kudospalojen koot saattavat patologian laboratoriossa vaihdella jonkin verran, minkä lisäksi kudostpalat leikataan joskus liian suuriksi kudostkasetteihin nähden. Tällaisissa tapauksissa varsinkaan suurimmat kudostpalat eivät välttämättä prosessoitu kunnolla tasaisesti. Nyt kun patologian laboratoriossa voidaan ottaa käyttöön lyhyempi prosessointiohjelma, olisi tärkeää etenkin rasvaisten näytteiden kohdalla, ettei makrokokoisia kudostkasetteja täytettäisi liian täyteen. Lyhyemmällä ohjelmalla liian suurikokoisten makronäytteiden prosessoituminen saattaisi jäädä entistä herkemmin vaillinaiseksi.

Näytteitä tarkasteltiin valomikroskoopilla kokeneen solubiologin kanssa, joten mikroskopoinnilla saatuja tuloksia voidaan pitää suhteellisen luotettavina. On kuitenkin hyvä tiedostaa, että mikroskopioijalla on aina subjektiivinen näkemys siitä, millaisilta histologisten värjäysten kuuluu näyttää. Joku toinen henkilö olisi siis saattanut arvioida tämänkin työn näytteet eri tavalla. Työn luotettavuutta olisi voinut lisätä se, että näytteiden

värjäytymisen ja kudismorfologian olisi pisteyttänyt ainakin toinen kokenut henkilö, kuten esimerkiksi patologi.

Kudosprosessointiin liittyviä aiempia tutkimuksia löytyi eri tietokannoista ja -aineistoista jonkin verran, ja niistä muutamista on sisällytetty tietoa tämän opinnäytetyön teoriaosuuteen. Yhtään sellaista tieteellistä tutkimusta, jossa prosessointia olisi yritetty nopeuttaa sen kestoja lyhentämällä, ei kuitenkaan löytynyt perusteellisesta etsimisestä huolimatta. Vaikka aiempia tutkimuksia olisikin löytynyt, ei niiden tuloksia olisi voinut verrata tämän työn tuloksiin, jos niissä käytetyt kudosten käsittelymenetelmät olisivat millään tavalla eronneet tämän työn menetelmistä. Kudoksen käsittelyn olisi siis oltava eri tutkimuksissa tismalleen samanlaista jo preanalyttisistä vaiheista eli fiksoinnista ja kudosten pienentämisestä alkaen, jotta kudosprosessoinnilla saadut tulokset olisivat vertailukelpoisia eri tutkimusten kesken. Jokaisen laboratorion onkin itse määritettävä optimaalisimmat kudosprosessointiohjelmat juuri niillä välineillä, laitteilla, näytteillä ja toimintatavoilla, joita kyseisessä laboratoriossa on käytössä.

Tässä tutkimuksessa ohjelmien 1 ja 2 välillä ei siis havaittu merkittävää eroa normaali- tai makrokokoisten rintänäytteiden leikkautumisessa tai kudismorfologiassa. Sen sijaan normaalikokoisten rintänäytteiden värjäytymisen kannalta ohjelma 2 näytti olleen hieman huonompi vaihtoehto. Kummassakaan ohjelmassa olleissa kohtunäytteissä ei ollut mitään moitittavaa. Näistä tuloksista voidaan päätellä, että jos prosessointiohjelma olisi lyhyempi kuin nyt testattu 41 tuntia ja 24 minuuttia, tuloksena saattaisi olla useampia kohtalaisesti tai jopa huonosti värjäytyneitä rintänäytteitä. Kohtukudosnäytteet taas osoittivat sen, että ohjelma 2 tai edes ohjelma 1 ei ole liian pitkä kyseiselle näytetyypille. Prosessointiohjelmaa olisi siis mahdollista jopa pidentää aavistuksen verran, jolloin rasvakudosta sisältävät näytteet prosessoituisivat hieman paremmin ja tällöin mahdollisesti värjäytyisivät paremmin, mutta tiiviimmät kohtukudoksen kaltaiset kudokset eivät kuitenkaan kuivuisi liikaa.

Kaiken kaikkiaan tämän tutkimuksen tulokset osoittivat, että normaali- ja makrokokoiset rasvakudosta sisältävät sekä muut makrokokoiset histologiset näytteet voidaan prosessoida PHKS:n patologian laboratoriossa kudosprosessointiohjelmalla, joka kestää kaksi päivää. Tähän asti kyseisten kudosten ohjelma on pystytty käynnistämään laboratoriossa kaksi kertaa viikossa, mutta nyt, kun prosessointi kestää kaksi päivää, näytteitä voidaan prosessoida kolme kertaa viikossa. Lyhyemmän prosessoinnin ansiosta näytteitä päästään myös jatkokäsittelyyn nopeammin, mikä taas aikaistaa patologin tekemään diagnoosia sekä niin ikään potilaan saamaa hoitoa.

Mahdollisissa jatkotutkimuksissa voisi esimerkiksi tutkia immunohistokemiallisten värjäysten avulla lyhennetyn kudoskuljetusohjelman vaikutuksia kudosten antigeenisyyteen. Lisäksi vertailua voisi tehdä eri kudospesointiautomaattien sekä erilaisten ohjelmien välillä. Samasta aiheesta tehtävässä seuraavassa tutkimuksessa voisi myös olla valikoima useampaa erilaista kudosta.

## LÄHTEET

- Abcam. Sectioning of paraffin-embedded tissue video protocol. Viitattu 10.8.2018. <https://www.abcam.com/protocols/sectioning-of-paraffin-embedded-tissue-video-protocol>.
- Aho, H. 1999. Histologiset menetelmät patologiassa. Turku: Turun yliopisto.
- Alwahaibi, N., Aljaradi, S. & Alazri, H. 2018. Alternative to xylene as a clearing agent in histopathology. *Journal of Laboratory Physicians*. Vol. 10, No. 2, 189-193.
- Anderson, J. 2012. An Introduction to routine and special staining. Leica biosystems. Viitattu 28.7.2018. <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-routine-and-special-staining/>.
- Azevedo Tosta, T.A., Neves, L.A. & do Nascimento, M.Z. 2017. Segmentation methods of H&E-stained histological images of lymphoma: A review. *Informatics in medicine unlocked*. Vol. 9, 35-43.
- Babu, T.M., Malathi, N. & Magesh, K.T. 2011. A comparative study on microwave and routine tissue processing. *Indian journal of dental research*. Vol. 22, No. 1, 50-55.
- Dey, P. 2018a. Fixation of histology samples: Principles, methods and types of fixatives. Teoksessa Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. Singapore: Springer, 3-13.
- Dey, P. 2018b. Haematoxylin and eosin stain of the tissue section. Teoksessa Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. Singapore: Springer, 69-79.
- Dey, P. 2018c. Tissue microtomy: Principle and procedure. Teoksessa Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. Singapore: Springer, 41-44.
- Gupta, S., Gautam, P. & Singh, B. 2016. The better version of routine tissue processing technique - modified tissue processing. *Indian journal of clinical anatomy and physiology*. Vol. 3, No. 4, 494-497.
- Heinrichs, H. 2007. Kudoskuljetusohjelmien vertailu rasvaisilla näytteillä. Opinnäytetyö. Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia.
- Helin, H. 2007. Nopeat kudostekniikat. *Moodi*. Vol. 31, No. 6, 213-214.
- Jali, P.K., Donoghue, M. & Gadiwan, M. 2015. A rapid manual processing technique for resource-limited small laboratories. *Journal of oral and maxillofacial pathology*. Vol. 19, No. 3, 306-314.
- Kamel, H.M.H. 2010. Trends and challenges in pathology practice: choices and necessities. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. Vol. 11, No. 1, 38-44.

- Kankkunen, P. & Vehviläinen-Julkunen, K. 2013. Tutkimus hoitotieteessä. 3. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Karttunen, T., Vuopala, K. & Soini, Y. 2005. Tautioppi. Helsinki: Edita.
- Laiho, M. 2015. Leanilla parempaa virtaustehokkuutta. *Moodi*. No. 6, 192-195.
- Launis, V. 2007. Moniarvoinen terveys. Turku: Areopagus.
- Mäkinen, M. 2012a. Kudosnäytteiden eri tyypit. Teoksessa Mäkinen, M., Carpen, O., Kosma, V., Lehto, V., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Duodecim.
- Mäkinen, M. 2012b. Näytteiden käsittely laboratoriossa. Teoksessa Mäkinen, M., Carpen, O., Kosma, V., Lehto, V., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Duodecim.
- Merriam-Webster. Morphology. Viitattu 13.10.2018. <https://www.merriam-webster.com/dictionary/morphology>.
- Mohammed, F., Arishiya, T.F. & Mohamed, S. 2012. Microtomes and microtome knives – A Review and proposed classification. *Annals of Dentistry*. Vol. 19, No. 2, 43-50.
- Mustajoki, P. & Kaukua, J. 2008. Koepalat kertovat diagnoosin. Terveyskirjasto Duodecim. Viitattu 10.6.2018. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk05080](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk05080).
- Naukkarinen, A. 1998. Hyvän histologisen valmisteen kriteerit. *Moodi*. Vol. 22, No. 1, 16-17.
- Niethammer, M., Borland, D., Marron, J.S., Woosley, J. & Thomas, N.E. 2010. Appearance Normalization of Histology Slides. *Machine learning in medical imaging.MLMI (Workshop)*. Vol. 6357, 58-66.
- Nummela, M. 2017. Lei-mikrotomia. Ohje leikkaajalle. Lahti: Päijät-Hämeen laboratorio- palvelujen ja lääkehuollon liikelaitos, patologia.
- Päijät-Hämeen hyvinvointiyhtymä. Laboratoriotutkimukset. Viitattu 20.6.2018. <https://www.phhyky.fi/fi/ammattilaisille/laboratoriokeskus/laboratoriotutkimukset/>.
- Pandey, P., Dixit, A., Tanwar, A., Sharma, A. & Mittal, S. 2014. A comparative study to evaluate liquid dish washing soap as an alternative to xylene and alcohol in deparaffinization and hematoxylin and eosin staining. *Journal of laboratory physicians*. Vol. 6, No. 2, 84-90.
- Paukku-Sani, S., Sarkkinen, H., Koivu, H., Nyrke, T. & Tani, T. 2018. Toimintakäsikirja. Lahti: Päijät-Hämeen laboratorio- palvelujen ja lääkehuollon liikelaitos.
- Pikander, P. 2015. Mitä oikeuslääkäriin tulee tietää diagnostisesta patologiasta? *Moodi*. Vol. 6, 198-200.

- Raheem, O. 2018. Kudosten fiksointi ja prosessointi. Abstrakti. Labquality Days. [https://www.labqualitydays.fi/wp-content/uploads/sites/2/2018/01/LQD18\\_Abst-rakti\\_Raheem\\_Olayinka.pdf](https://www.labqualitydays.fi/wp-content/uploads/sites/2/2018/01/LQD18_Abst-rakti_Raheem_Olayinka.pdf).
- Rantala, S. 2014. Histologisten näytteiden käsittely patologian laboratoriossa. *Bio-analyttikko*. Vol. 1, 37-39.
- Rhodes, A. 2013. Fixation of tissues. Teoksessa Suvarna, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (toim.) *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7. painos: Elsevier, 69-93.
- Rolls, G. 2012. Factors influencing chemical fixation, formaldehyde and glutaraldehyde. Leica Biosystems. Viitattu 2.6.2018. <https://www.leicabiosystems.com/pathology-leaders/fixation-and-fixatives-2-factors-influencing-chemical-fixation-formaldehyde-and-glutaraldehyde>.
- Rolls, G. 2011. An introduction to specimen preparation. Leica biosystems. Viitattu 10.9.2018. <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-specimen-preparation/>.
- Rolls, G. 2010. Microtomy and paraffin section preparation. Leica biosystems. Viitattu 11.8.2018. <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/microtomy-and-paraffin-section-preparation/>.
- Salonen, K. 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön - Opas opiskelijoille, opettajille ja TKI-henkilöstölle. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- Shrestha, G., Karki, S. & Pradhan, A. 2015. Changing perspective on tissue processing - comparison of microwave histoprocessing method with the conventional method. *Journal of Pathology of Nepal*. Vol. 5, No. 10, 841-846.
- Spencer, L.T. & Bancroft, J.D. 2013. Tissue processing. Teoksessa Suvarna, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D.; (toim.) *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7. painos. Oxford: Churchill Livingstone/Elsevier, 105-123.
- Suomen Bioanalyttikkoliitto ry. 2017. Kliininen histologia ja sytologia. Viitattu 10.3.2018. <https://www.bioanalyttikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalyttikko/bio-analyttikon-koulutus/erikoisalajat/kliininen-histologia-ja-sytologi/>.
- Suvarna, S.K. & Layton, C. 2013. The gross room/surgical cut-up. Teoksessa Suvarna, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (toim.) *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. 7. painos, 95-103.
- Terveyskirjasto Duodecim. Histologia. Lääketieteen sanasto. Viitattu 9.6.2018. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ltt01158](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01158).
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 14.7.2018. <http://www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanto>.

Tyks laboratoriot. Tutkimusohjekirja. Viitattu 20.6.2018. <http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?fp=1>.

University of Leeds. 2003. The Histology guide. Viitattu 5.8.2018. <https://histology.leeds.ac.uk/index.php>.

Vilkkä, H. 2007. Tutki ja mittaa. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

## Kudosprosessointiohjelmat

Ohjelma 1			
Reagenssi	Lämpötila (°C)	Aika (t.min)	Vakuumi
1. Formaliini	Ympäristön lämpötila	1.00	Ei
2. Vesi	Ympäristön lämpötila	0.30	Ei
3. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	7.00	Kyllä
4. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	7.00	Kyllä
5. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	3.00	Kyllä
6. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	4.00	Kyllä
7. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	4.00	Kyllä
8. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	4.00	Kyllä
9. Ksyleeni	Ympäristön lämpötila	2.00	Kyllä
10. Ksyleeni	Ympäristön lämpötila	3.00	Kyllä
11. Ksyleeni	Ympäristön lämpötila	3.00	Kyllä
12. Parafiini	62	6.00	Kyllä
13. Parafiini	62	6.00	Kyllä
14. Parafiini	62	5.00	Kyllä

Ohjelma 2			
Reagenssi	Lämpötila (°C)	Aika (t.min)	Vakuumi
1. Formaliini	Ympäristön lämpötila	0.10	Ei
2. Vesi	Ympäristön lämpötila	0.30	Ei
3. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	5.00	Kyllä
4. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	5.00	Kyllä
5. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	2.00	Kyllä
6. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	3.00	Kyllä
7. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	3.00	Kyllä
8. Alkoholi	Ympäristön lämpötila	3.00	Kyllä
9. Ksyleeni	Ympäristön lämpötila	1.30	Kyllä
10. Ksyleeni	Ympäristön lämpötila	2.00	Kyllä
11. Ksyleeni	Ympäristön lämpötila	2.30	Kyllä
12. Parafiini	62	4.30	Kyllä
13. Parafiini	62	4.30	Kyllä
14. Parafiini	62	4.30	Kyllä

## Rintanäytteiden arviointilomake

Näyte	Leikkautuminen				Värjäytyminen				Kudosmorfologia			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
1 A				x				x				x
1 B				x			x					x
2 A				x				x				x
2 B				x			x					x
3 A				x				x				x
3 B			x					x				x
4 A				x				x				x
4 B				x			x				x	
5 A				x				x				x
5 B				x			x				x	
6 A				x				x				x
6 B				x				x				x
7 A				x				x				x
7 B				x			x					x
8 A				x				x				x
8 B				x				x				x
9 A			x					x				x
9 B				x				x				x
10 A				x			x					x
10 B				x			x					x
11 A				x			x					x
11 B				x			x					x
12 A			x					x				x
12 B				x				x				x

## Kohtunäytteiden arviointilomake

Näyte	Leikkautuminen				Värjäytyminen				Kudosmorfologia			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
1 A				x				x				x
1 B				x				x				x
2 A				x				x				x
2 B				x				x				x
3 A				x				x				x
3 B				x				x				x
4 A				x				x				x
4 B				x				x				x
5 A				x				x				x
5 B				x				x				x
6 A				x				x				x
6 B				x				x				x
7 A				x				x				x
7 B				x				x				x
8 A				x				x				x
8 B				x				x				x