

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Patologia

2014

Mira Jalonen ja Juho Kurki

KOVAKUDOSNÄYTTEIDEN DEKALSIFIOINTIMENETELMIEN OPTIMOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Patologia

30.5.2014 | Sivumäärä 36

FT Sanna Virtanen

Mira Jalonen ja Juho Kurki

KOVAKUDOSNÄYTTEIDEN DEKALSIFIOINTIMENETELMIEN OPTIMOINTI

Histologia eli kudospoppi tarkastelee kudoksen morfologista rakennetta. Ihmiselimestöstä löytyy neljää eri kudostyyppiä: Lihas-, tuki-, hermo- sekä epiteelikudosta. Histologian laboratorioissa tutkitaan ja käsitellään toimenpiteiden yhteydessä otettuja kudospaloja. Jotta kudosta voidaan tarkastella tarkemmin mikroskooppisesti, se täytyy ensin prosessoida histologisin menetelmin.

Dekalsifointi on kovakudosnäytteen (luukudos) pehmentämiseen tarkoitettu prosessi, jossa kovakudosnäytteen sisältämä kalsium poistetaan kemiallisesti joko happoja tai kelatoivaa liuosta käyttämällä. Kelatoiva EDTA eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo sitoo metalli-ioneja, etenkin kalsiumia ja magnesiumia. EDTA:n etu verrattuna muurahaishappoon ja DeCalc-liuokseen on sen kyky olla vaurioittamatta luun kudusrakenteita. Haittana on kuitenkin pitkä käsittelyaika.

Kovakudosnäytteen dekalifioitumista on mahdollista nopeuttaa nostamalla lämpötilaa esimerkiksi mikroaaltouunimenetelmällä. Lämpötilan nosto kuitenkin saattaa vaurioittaa käsiteltävää näytettä erityisesti happoja käytettäessä. Näytteen liiallinen lämpökäsittely heikentää myös värjäytyvyyttä sekä solumorfologiaa.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia miten mikroaaltouunikäsittely vaikuttaa dekalifioitumisen nopeuteen ja kudoksen laatuun eri dekalifiointiliuoksissa ja lämpötiloissa. Tässä opinnäytetyössä käytettiin kolmea dekalifiointiliuosta: EDTA:a, muurahaishappoa ja kaupallista DeCalc suolahappoliuosta. Tutkittavina lämpötiloina toimivat huoneenlämpö, +37 °C ja +50 °C. Tässä opinnäytetyössä tutkittavien kudospalojen määrä oli 54.

Tutkimustulosten mukaan kovakudosnäytteen dekalifioitumista voitiin nopeuttaa ilman, että kudusmorfologia kärsi käyttämällä muurahaishapon ja mikroaaltouunikäsittelyn yhdistelmää, kun lämpötilaksi säädettiin + 37 °C.

ASIASANAT:

(Dekalsifointi, Kovakudos, Lämpökäsittely)

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science | Pathology

30.5.2014 | Total number of pages 36

FT Sanna Virtanen

Mira Jalonen and Juho Kurki

OPTIMIZATION OF DECALCIFICATION METHODS IN HARD TISSUE SAMPLES

Histology is the study of the morphology of tissues. There are four different types of tissue in a human body. Those are connective-, muscular-, epithelial- and nervous tissue. In the laboratory of histology the studied tissues are usually collected during medical procedures. In order to examine the tissue with microscope tissues must go through histological sample processes.

Decalcification is a process where the bone samples are softened by removing the inorganic calcium chemically with acids or chelating agents. EDTA or ethylenediaminetetraacetic chelates divalent metals ions such as calcium and magnesium. The advantage of EDTA compare to other decalcification agents is that it doesn't easily damage the histological structure of the bone. The disadvantage is that its slow decalcification rate.

It is possible to speed up the decalcification process by increasing the temperature for example with microwaves. The increase in temperature can, however, damage the histology of the sample especially when using acidic decalcifiers. Excessive heating can reduce the stainability of the tissue and damage the tissue morphology.

The aim of the thesis was to study how microwaves effect on the time of the calcification and the quality of the bone tissue samples with three different decalcification agents: EDTA, formic acid and commercially produced DeCalc. The used treatment-temperatures were room temperature (RT), +37 °C and +50 °C. The number of used tissue samples was 54.

The results showed that the combination of formic acid and microwaves in the temperature of +37 °C accelerated the decalcification and in addition, maintained also the quality of the tissue morphology.

KEYWORDS:

Decalcification, hard tissue, heat processing

SISÄLTÖ

| | |
|--|-----------|
| 1 JOHDANTO | 7 |
| 2 TEOREETTINEN TAUSTA | 8 |
| 2.1 Kovakudos | 8 |
| 2.2 Dekalsifiointi | 9 |
| 2.2.1 Yleistä | 9 |
| 2.2.2 Dekalsifointiaineet | 10 |
| 2.2.3 Lämpötilan vaikutus dekalsifointiin | 11 |
| 2.2.4 Dekalsifioitumisen seuranta | 11 |
| 2.3 Histologisen näytteen käsittely | 12 |
| 2.3.1 Histologia | 12 |
| 2.3.2 Kiinnitys eli fiksaatio | 12 |
| 2.3.3 Lämpökäsittely | 13 |
| 2.3.4 Kudosprosessointi | 13 |
| 2.3.5 Parafiinileikkeet | 14 |
| 2.3.6 Värjäys | 15 |
| 3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT | 16 |
| 3.1 Tarkoitus ja tavoite | 16 |
| 3.2 Tutkimustehtävät | 16 |
| 4 TUTKIMUSMENETELMÄT | 17 |
| 4.1 Tutkimusmenetelmä | 17 |
| 4.2 Opinnäytetyön toteutus | 17 |
| 4.3 Tutkimusaineiston hankinta ja käsittely | 18 |
| 4.4 Tutkimuksen suoritus | 19 |
| 5 TUTKIMUSTULOKSET | 21 |
| 5.1 Yleistä | 21 |
| 5.2 EDTA RT | 21 |
| 5.2.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu | 22 |
| 5.3 EDTA +37 °C ja EDTA +50 °C | 22 |
| 5.4 Muurahaishappo RT | 24 |
| 5.4.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5 Muurahaishappo +37 °C | 25 |
| 5.5.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu | 25 |
| 5.6 Muurahaishappo +50 °C | 26 |
| 5.6.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu | 27 |
| 5.7 DeCalc RT | 27 |
| 5.7.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu | 27 |
| 5.8 DeCalc +37 °C | 29 |
| 5.8.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu | 29 |
| 5.9 DeCalc +50 °C | 30 |
| 5.9.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu | 30 |
| 6 POHDINTA | 32 |
| 6.1 Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys | 32 |
| 6.2 Johtopäätökset | 32 |
| 6.3 Tutkimuksen hyödynnettävyys ja jatkotutkimusaiheet | 34 |
| 6.4 Kiitokset | 34 |
| LÄHTEET | 35 |

LIITTEET

- Liite 1. Tutkimuslupa.
- Liite 2. Työohje: HE-värjäys.
- Liite 3. Näytteiden leikkautuvuuden arviointi.
- Liite 4. EDTA 5 % -liuos, valmistusohje (5000 ml).
- Liite 5. Näytteiden kudismorfologian arviointi.
- Liite 6. Tutkimustulokset.

KUVAT

| | |
|---|----|
| Kuva 1. HE-värjäys huoneenlämmössä EDTA-liuoksessa dekalsifoidulle näytteelle (40x)..... | 22 |
| Kuva 2. HE-värjäys mikroaaltouunimenetelmällä muurahaishapossa dekalsifoidulle näytteelle (+37 °C) (40x)..... | 26 |
| Kuva 3. HE-värjäys huoneenlämmössä DeCalc-suolahappoliuoksessa dekalsifoidulle näytteelle (40x)..... | 28 |
| Kuva 4. HE-värjäys mikroaaltouunimenetelmällä DeCalc-suolahappoliuoksessa dekalsifoidulle näytteelle. (+50 °C) (40x)..... | 31 |

TAULUKOT

| | |
|--|----|
| Taulukko 1. Näytetiedot | 18 |
| Taulukko 2. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot. (EDTA RT)..... | 21 |
| Taulukko 3. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot. (EDTA, +37 °C) | 23 |
| Taulukko 4. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (EDTA, +50 °C) | 23 |
| Taulukko 5. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (Muurahaishappo, RT)..... | 24 |
| Taulukko 6. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (Muurahaishappo, +37 °C) | 25 |
| Taulukko 7. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (Muurahaishappo, +50 °C) | 26 |
| Taulukko 8. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (DeCalc, RT) | 27 |
| Taulukko 9. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (DeCalc, +37 °C) | 29 |
| Taulukko 10. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (DeCalc, 50 °C) | 30 |

1 JOHDANTO

Viimeisten vuosikymmenien aikana diagnostisen patologian kehitys on ollut nopeaa. Tieto sairauksien syntymekanismeista on lisääntynyt ja näin ollen diagnostiikkaa on pystytty kehittämään ja tarkentamaan entisestään. Histologisen näytteen kuduskäsittelyprosessi fiksaatiosta parafiinin imeytykseen on pysynyt samanlaisena runsaan sadan vuoden ajan. Myös diagnostisen patologian tutkimuksen läpimenoaika on pysynyt samansuuruisena pitkään. Histologista kudosprosessia pyritään kehittämään kuitenkin kaiken aikaa nopeuttamalla prosessia sekä pyrkimällä eroon haitallisista kemikaaleista. (Helin 2007.) Osa näytteistä sisältää kovakudosta, joka tulee käsitellä erikseen, jotta näyte saadaan tutkittavaan muotoon.

Luukudos on yleisin kovakudostyyppi, joka vaatii erillistä esikäsittelyä patologian laboratoriossa. Luukudoksen lisäksi on myös muita kudostyyppisiä, jotka ovat liian kovia käsittelemättömänä. Tällaisia ovat esimerkiksi erilaiset kalkkeumat ja plakkikertymät. (Dimenstein 2012.)

Dekalsifointi on prosessi, jossa kovakudosnäytteen kalsiumsuolat hajotetaan ja näin ollen näytteestä tulee pehmeämpi ja näytteen leikkaus mahdollistuu. Dekalsifointiin voidaan käyttää useita eri kemiallisia yhdisteitä, kuten suolahappoa, muurahaishappoa tai etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA). (Bancroft & Gamble 2008.) Mikroaaltouunimenetelmällä voidaan nopeuttaa luun dekalسيومitumista ja näin ollen näytteen käsittelyaika nopeutuu (Tinling ym. 2004).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kolmen eri dekalسيومitiliuksen; EDTA:an, muurahaishapon ja Decalc-liuksen vaikutusta dekalسيومoitumisen nopeuteen sekä tutkia miten mikroaaltokäsittely eri lämpötiloissa vaikuttaa dekalسيومoinnin nopeuteen sekä kudoksen laatuun. Tutkimuksen tavoitteena oli löytää nopea ja kudoksille hellävarainen dekalسيومointimenetelmä.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Kovakudos

Ihmisen tuki- ja liikuntaelimistön muodostavat luusto ja luustolihakset. Ihmisessä on yli 200 erillistä luuta. Ne ovat kiinni toisissaan erilaisten liitosten avulla, joita nivelsiteet sekä muut rakenteet tukevat. Lihakset ovat kiinnittyneet luihin jänteiden avulla, minkä takia luut liikkuvat lihasten supistuessa. Elimistön tukiranka muodostuu luustosta, joka myös suojaa sisäelimiä. Luusto osallistuu myös verisolujen tuottamiseen. Suurin osa verisoluista tuotetaan niin sanotussa punaisessa luuytimessä. Luusto on myös elimistön kalsiumin ja fosfaatin varasto. Näin ollen se säätelee osaltaan veren fosfaatti- ja kalsiumpitoisuuksia. (Leppäluoto ym. 2013.)

Ihmisen luut jaetaan kahteen luutyyppiin, pitkiin luihin ja lyhyisiin luihin. Pitkiä luita löytyy raajoista ja lyhyitä esim. nilkasta, selkärangasta ja ranteesta. Rintalasta ja kallon luut ovat litteitä luita. (Leppäluoto ym. 2013.) Litteät luut ovat elimiä suojaavia panssareita (Bancroft & Gamble 2008).

Kovakudosnäyte on kudostyypiltään yleisimmin kovaa luuta. Patologian laboratorioon saapuvan kovakudosnäytteen koko voi olla hyvinkin vaihteleva. Näytteen koko vaihtelee muutaman millimetrin mittaisesta luupalasta kokonaiseen raajaan. Luuytimestä näyte eli koepala voidaan ottaa myös neulalla, tätä kutsutaan luuydinbiopsiaksi. (Bancroft & Gamble 2008.)

Luukudos koostuu erilaisista mineraaleista, joista tärkeimpiä ovat kalsiumfosfaatit. Kalsiumfosfaatit tekevät luusta kovan ja vastaavat puristuslujuudesta. Luulla on myös hyvä taivutus- ja vetolujuus jonka aikaansaavat orgaaniset kollageenisyyt. Luukudoksessa on runsas verisuonitus, jonka avulla luukudoksen solut saavat tarvitsemansa ravintoaineet. (Leppäluoto ym. 2013.) Luun koostumuksesta noin 70 prosenttia on epäorgaanisia suoloja ja noin 30 prosenttia orgaanisia molekyylejä. Suurin osa epäorgaanisista suoloista on kalsiumfosfaattia, joka esiintyy pääosin kiteisenä hydroksiapatiittina. (Callis 2008.)

Osteoblastit, osteoklastit ja osteosyytit osallistuvat luukudoksen muokkaukseen. Luukudoksen muodostumiseen osallistuvat osteoblastisolut, jotka tuottavat kollageeniverkkoja eli luukudoksen perusaineksen, johon fosforin ja kalsiumin suolat kiinnittyvät (hydroksiapatiitit). Osteoblastit kypsyvät lopulta osteosyyteiksi eli luusoluiksi, jotka jäävät luuaineksen sisään, jonka ovat tuottaneet. Osteosyytit asettuvat kehämäisesti verisuonikanavien ympärille luoden pyöreitä rakenteita. Rakenteita kutsutaan osteoneiksi. Luukudoksen hajottamisesta vastaavat osteoklastit, jotka hajottavat osteoblastien rakentamaa luuta jatkuvasti. Elimistö säätelee tarkasti osteoblastien ja osteoklastien toimintaa. (Leppäluoto ym. 2013.)

Luun tiheys ja laatu määrittää luun lujuuden. Luulla on erilaisia laatuominaisuuksia kuten mineralisaatioaste, mikrorakenne, aineenvaihduntanopeus, kollageenin rakenne ja mikroauriot. Luukudoksen mineraalimäärä vähenee iän myötä ja mikäli väheneminen on runsasta, sitä kutsutaan osteoporoosiksi eli luiden haurastumiseksi. Luukato on yleisempää naisilla varsinkin vaihdevuosien jälkeen. (Terveyskirjasto 2014.)

2.2 Dekalsifointi

2.2.1 Yleistä

Laadukkaiden luukudosta sisältävien parafiinileikkeiden aikaansaamiseksi luukudosta on käsiteltävä. Luukudoksesta tulee poistaa sen sisältämä kalsium, jotta luukudoksesta tulee pehmeää ja sitä on helpompi työstää jatkossa. Dekalsifointi on prosessi, jossa kalsiumin suoloja sisältävästä kovasta luusta tehdään pehmeää hajottamalla kovakudosnäytteen eli luun kalsiumsuoloja kemiallisesti. Tämä tapahtuu erilaisten kalsiumia poistavien happojen tai kelatoivien eli metalli-ioneja, kuten kalsiumia ja magnesiumia sitovien aineiden avulla. Dekalsifointimenetelmän valintaan vaikuttaa muun muassa potilastutkimuksen kiireellisyys, laajuus ja vaadittu värjäystekniikka. (Sterchi 2013.)

2.2.2 Dekalsifointiaineet

Dekalsifointiin käytettävät hapot voidaan jakaa kahteen ryhmään: vahvat epä-organiset hapot ja heikot orgaaniset hapot. Vahvoja happoja ovat esimerkiksi 5-10-prosenttinen typpi- ja suolahappo. Ne dekalasioivat nopeasti, mutta aiheuttavat kudoksen solurakenteen ja värjäytyvyyden vaurioitumista mikäli kudoksesta on pidempään kuin 24 - 48 tuntia tällaisessa liuoksessa. Vahvoja happoja käytetään yleensä kiireellisiin biopsianäytteisiin. (Sterchi 2013.)

Heikoista hapoista muurahaishappo on käytetyin ja hellävaraisempi, mutta vaatii dekalasioinnissa huomattavasti enemmän aikaa. Muurahaishappoa käytetään yleensä rutiininäytteisiin sekä näytteissä, jotka vaativat immunohistokemiallisen värjäyksen. Dekalsifointi muurahaishapolla kestää usein 1-10 päivää riippuen kudospalan koosta, luutyypistä ja hapon vahvuudesta. Muita dekalasiointiin käytettäviä heikkoja happoja ovat etikka- ja pikriinihappo. Ne kuitenkin aiheuttavat kudoksen turpoamista ja siksi niitä käytetään vain joissakin fiksativissa luukudoksen pehmentäjänä. (Sterchi 2013.)

Kelatoiva EDTA eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo on liuoksena hellävaraisin eikä helposti vaurioita luun solurakennetta. EDTA ei sido kalsiumia pH:n ollessa alle 3 ja sen kyky dekalasioida onkin optimaalinen pH:n ollessa 7-7.4. Liian alhainen tai korkea pH myös vaurioittaa kudosta. Dekalsifointi EDTA:n avulla on hidasta ja prosessiin saattaa kulua useita viikkoja tai kuukausia. Näytteen koolla on suurin merkitys dekalasioitumisen nopeuteen. (Sterchi 2013.)

Kaupallisten dekalasiointiaineiden koostumus on salainen. Tuotetiedoista käy ilmi kaupallisen dekalasiointiaineen nopeus. Nopeat aineet yleensä sisältävät suolahappoa kun taas hitaammat seokset sisältävät puskuroitua muurahaishappoa tai formaliinin ja muurahaishapon yhdistelmää. Myös kelatoivia reagensseja kuten EDTA:a on saatavilla valmiina liuoksena. (Sterchi 2013.)

Dekalsifointia seurataan fysikaalisin, kemiallisin ja mekaanisin testein, esimerkiksi röntgenkuvauksen avulla tai neulalla tunnustelemalla. Tärkeimmät dekalasioinnin nopeuttamisen keinot ovat lämpötilan nosto tai dekalasiointiliuosten vä-

kevöittäminen. Muita nopeuttajia ovat mikroaallot ja ultraääni. (Aho 1999.) Luun lisäksi on myös muita kudoksia jotka tarvitsevat dekalsifointia, jotta niitä voidaan tarkistella histologisesti. Tällaisia ovat muun muassa kalsifioituneet kasvaimet, kalsifioituneet sydänläpät sekä valtimokovettumat. (Dimenstein 2012.)

2.2.3 Lämpötilan vaikutus dekalsifointiin

Lämpötilan nosto nopeuttaa monia kemiallisia reaktioita, kuten dekalsifointia, mutta se myös samalla lisää happojen kykyä vaurioittaa kudosta. Lämpötilan ollessa +60 °C luu, pehmytkudos sekä solut saattavat hajota heti dekalsifioitumisen jälkeen. Optimaalista lämpötilaa dekalsifointiin ei ole määritetty, mutta +18 – +30 °C on suositeltu käytettävän. (Sterchi 2013.)

Jos dekalsifointiliuoksena käytetään happojen sijaan EDTA:a ja sen lämpötilaa nostetaan, kudoksen hajoamisriskiä ei ole. Kuitenkin tämä saattaa heikentää antigeenien ja entsyymien säilymistä kudoksessa. Mikäli luukudos on hyvin fiksoitunut, dekalsifointi +60 °C:ssa EDTA:ssa on mahdollista. (Sterchi 2013.)

2.2.4 Dekalsifioitumisen seuranta

Dekalsifioitumista ja luun pehmenemistä voidaan seurata erilaisilla testeillä kuten neula- ja kalsiumoksalattitesteillä. Kalsiumoksalattitestillä osoitetaan kalsiumin läsnäolo happoliuoksessa saostamalla kalsium. Neulatesti on fysikaalisista testeistä käytetyin. Neulatestissä kudoksen kovuutta tarkistetaan tasaisin väliajoin dekalsifioinnin edetessä. Käytettäessä vahvoja happoja, esimerkiksi suola- ja typpihappoa, kalsiumin poistoon, testejä suositellaan käytettävän päivittäin. Testejä suositellaan tehtäväksi useammin, jopa viiden tunnin välein, dekalsifioinnin edetessä. EDTA-liuosta käytettäessä, testejä voidaan suorittaa liuoksen vaihdon yhteydessä ja lisätä tarpeen vaatiessa testauskertoja dekalsifioitumisen edetessä. (Callis 2008.)

2.3 Histologisen näytteen käsittely

2.3.1 Histologia

Histologialla tarkoitetaan oppia kudusrakenteesta. Kudosta ei yleensä voi sellaisenaan mikroskopoida, vaan se tarvitsee ensin kiinnittää (fiksoida) ja valaa valuaaineeseen, joka jähmettyy. Tämän jälkeen näytteestä leikataan leikkeitä, jotka värjätään eri värjäysmenetelmiä käyttäen. (Aho 1999.)

2.3.2 Kiinnitys eli fiksaatio

Asianmukainen kudosten fiksaatio on histologisen tutkimuksen kannalta erittäin tärkeää. Fiksatiivin tärkein ominaisuus patologiassa on säilyttää kudoksen morfologia mahdollisimman muuttumattomana. Kuitenkin kaikki fiksointitavat aiheuttavat kudokselle erilaisia vaurioita. Yleensä kudoksen fiksaation yhteydessä turpoaa tai kutistuu sekä kovettuu. (Sterchi 2013.)

Fiksaatio estää autolyysin, joka tarkoittaa kudoksen omien entsyymien ja bakteerien toiminnasta aiheutuvaa kudoksen hajoamista. Fiksaatio helpottaa myös kudoksen jatkokäsittelyä, koska se kiinteyttää käsiteltävää kudosta säilyttäen silti sen fysiologisen muodon. Fiksaatioaineet ovat yleensä vesipohjaisia liuoksia, jotka aiheuttavat kudoksen valkuaisaineiden välille poikkisidoksia. Tämän muodostuvan geelin ansiosta kudoksen eri osat pysyvät sijainniltaan muuttumattomina. (Aho 1999.)

Formaliini on käytetyin kemiallinen fiksatiivi patologiassa (Sterchi 2013). Se on kaupallisesti saatava liuos ja se sisältää 4 prosenttia formaldehydiä, mikä on väritön kaasu. Formaldehydi on vesiliukoinen ja vesiliuoksessa se on yleensä monohydraatina, metyleeniglykolina. Tämän lisäksi vesiliuoksessa on myös varsinaisesta fiksaatiosta vastaava monomeerinen formaldehydi, jota liuoksessa on metyleeniglykolia vähemmän. Yleensä kaupallinen formaliini sisältää jonkin verran orgaanisia ja epäorgaanisia epäpuhtauksia kuten metanolia ja muura-

haishappoa. Formaliinifiksaatiota on mahdollista nopeuttaa mikroaaltouunissa. (Aho 1999.)

2.3.3 Lämpökäsittely

Lämpökäsittelyllä voidaan nopeuttaa kudoksen prosessointia. Se aiheuttaa molekyylien liikettä, mikä saa aikaan kudoksen sidosten aukeamisen ja kemiallisten reaktioiden nopeutumisen. Lämpökäsittelyyn voidaan käyttää mikroaaltoja, jotka eivät vahingoita kudoksen morfologiaa, koska mikroaaltoenergia ei ole riittävän voimakasta pystyäkseen rikkomaan vetysidoksia tai kovalenttisia sidoksia. (Saranen 2005.)

Elektromagneettisia mikroaaltoja säätelee magneettinen ja sähköinen kenttä. Mikroaaltojen avulla luotu säteily aiheuttaa lämpenemisen ja tätä molekyylien liikkeestä johtuvaa lämpenemistä käytetään parantamaan kudoksen fiksaatiota. Mikroaallot vaikuttavat kudokseen siten, että aineiden diffuusio kudokseen ja kudoksesta ulos nopeutuu. (Saranen 2005.)

Mikroaallot, jotka vaihtovirtakenttä tuottaa, ohjataan jatkuvana virtana metallilla suojattuun näytekammioon. Tämä tapahtuu aallonohjaimen kautta. Metallilla suojattu näytekammio estää pienempien mikroaaltojen poistumisen kammioista. Kammion sisälle muodostuu alueita, joissa mikroaaltoenergia vaihtelee kylmästä kuumaan. Syntyneitä eroja pyritään välttämään yleensä näytettä sekoittamalla. Yleensä laboratorion käytössä olevat laitteet sisältävät aallonsekoittajan. (Saranen 2005.)

2.3.4 Kudospesessointi

Kudosprosessin vaiheet ovat vedenpoisto, kirkastus, parafiinin imeytys sekä valu. Koneellisessa kudospesessä käytetään määrättyä liuosta ja käsittelyaika on tarkkaan valittu. (Spencer & Bancroft 2013.)

Kudosprosessointi alkaa vedenpoistolla eli dehydraatiolla, jolloin nousevalla alkoholisarjalla kudoksesta poistetaan vesi sekä fiksaatiivi. Dehydrointi aloitetaan tavallisesti 50 tai 70 prosentin etanolilla ja liuoksen väkevyyttä nostetaan viidenkymmenen prosenttiyksikön välein absoluuttiseen alkoholiin asti. (Aho 1999.)

Vedenpoiston jälkeen kudoksesta poistetaan alkoholi, yleensä ksyleenillä. Vaihetta kutsutaan kirkastukseksi. (Spencer & Bancroft 2013.) Kudosnäytteestä on poistettava etanoli, koska etanoli ja parafiini eivät ole keskenään liukoisia. Huomioitavaa on, että kudosnäyte ei saa olla ksyleenissä liian kauan ettei kudoksessa tapahdu liiallista kutistumista kuivumisesta. (Aho 1999.) Kirkastus valmistaa kudosnäytteen imeytysvaiheeseen. Imeytyksessä parafiini infiltroidaan kudosnäytteen sisälle. (Spencer & Bancroft 2013.)

Viimeisenä vaiheena suoritetaan valu, jossa kudos tukimateriaalin avulla kovetetaan. Yleisin valussa käytettävä tukimateriaali on parafiini. (Spencer & Bancroft. (2013.) Mineraalipohjainen ja vahamainen parafiini on hiilivetyseos. Siihen lisätään usein erilaisia aineita kovuuden lisäämiseksi. Tämä mahdollistaa ohuiden ja siten laadukkaiden leikkeiden tuoton. Lisäksi lisäaineiden myötä kudoksen leikkautuvuus paranee. (Aho 1999.)

Valuvaiheessa valukoneen lämpölevyllä kudospala siirretään kasetista valumuottiin leikkauspinta alaspäin ja muottiin valutetaan kuumaa parafiinia. Tämän jälkeen valumuotilla valmistettu parafiiniblokki jäähdytetään. (Aho 1999.)

2.3.5 Parafiinileikkeet

Parafiiniblokit leikataan mikrotomilla. Leikattaessa syntyvät leikkeet ovat paksuudeltaan 4-7µm. Leikkeet siirretään kylmävesihauteeseen (+20 °C), josta ne poimitaan objektilaseille. Muun muassa dekalsifioitu kudos pysyy lasilla huonosti, joten objektilasi joudutaan joissakin tapauksissa käsittelemään kiinnittävällä aineella. Lasit leikkeineen siirretään lämpimään vesihauteeseen (+45 °C), jossa kudoksen ympärillä oleva parafiini pehmenee ja leikettä voi tarvittaessa suoris-

taa. Lopuksi laseilla olevat leikkeet valutetaan ja siirretään lämpökaappiin (+60 °C). (Aho 1999.)

2.3.6 Värjäys

Leikkeistä poistetaan ennen värjäystä parafiini ksyleenillä sekä palautetaan vesi laskevassa alkoholisarjassa. Kudosleikkeisiin käytettävät värjäysmenetelmät voidaan jakaa seuraaviin pääryhmiin: perinteiset värjäykset, immunohistokemia, entsyymihistokemia, lektiinihistokemia sekä hybridisaatiohistokemia. Useat värjäykset voidaan tehdä värjäyskoneen avulla. Värjäyksiä on mahdollista nopeuttaa mikroaalloilla, jolloin aineiden diffuusionopeus lisääntyy. Tällöin värin lämpötila nousee ja sitoutuminen ionisoituneiden väriaineiden osalta kasvaa. (Aho 1999.)

Yleisin histokemiallinen värjäysmenetelmä on hematoksyliini-eosiinivärjäys, eli HE-värjäys (liite 2). Värjäyksessä hematoksyliini on tumavärinä eosiinivärjätessä muun muassa sidekudosta, lihaskudosta ja eosinofiilejä. (Naukkari 2000.) Hematoksyliini-eosiini värjäyksessä solujen tumien väri saattaa vaihdella sinisestä mustaan ja solulima on vaaleanpunaista (Solunetti 2006).

Weigert-Van Gieson-värjäys eli WvG-värjäys on toinen patologian laboratorioissa käytössä oleva yleisvärjäys, joka värjää sidekudosta (Mäkinen 2012). Värjäävät ainesosat ovat Van Giesonin pikrofuksiini ja Wiegertin hematoksyliini (Reagen Oy 2011). Värjäyksessä pikriinihappo värjää soluliman, fibriinin ja lihaskudoksen keltaiseksi. Fuksiini sen sijaan värjää sidekudoksessa olevat kollageenit punaiseksi. Rautahematosykliini toimii värjäyksessä tumavärinä. (Aho 1999.)

Värjäyksen jälkeen leikkeet dehydroidaan nousevassa alkoholisarjassa ja kirkaustetaan ksyleenillä. Leikkeisiin laitetaan vielä päällystysainetta ennen peitin-lasin kiinnittämistä. (Aho 1999.)

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

3.1 Tarkoitus ja tavoite

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla kolmea eri dekalsifointiliuosta; EDTA-sakkarosia, muurahaishappoa ja Decalc-liuosta sekä tutkia miten mikroaaltokäsittely eri lämpötiloissa vaikuttaa dekalsifoinnin nopeuteen ja kudoksen laatuun. Tutkimuksen tavoitteena oli löytää nopea ja kudoksille hellävarainen dekalsifointimenetelmä.

Tutkimukseen käytettävät luunäytteet kerättiin viidestä eri ihmisestä. Heistä jokaisesta otettiin yhdeksän näytettä, yksi näyte yhtä käsittelyä kohti. Kudospalojen yhteismäärä oli 54.

3.2 Tutkimustehtävät

Tutkimustehtävänä oli verrata kolmen eri dekalsifointiliuoksen vaikutusta testikudokseen sekä tutkia miten mikroaaltokäsittely eri lämpötiloissa (huoneenlämpö, +37 °C ja +50 °C) vaikuttaa dekalsifoinnin nopeuteen ja kudoksen laatuun. Mikroaaltokäsittely suoritettiin Milestone KOS –laitteella. Dekalsifioitumista seurattiin kudosta neulalla tunnustelemalla. Dekalsifoidut kudokset leikattiin ja värjättiin HE-värjäyksellä.

4 TUTKIMUSMENETELMÄT

4.1 Tutkimusmenetelmä

Tämä tutkimus oli vertaileva kvantitatiivinen tutkimus, jossa vertailtiin eri dekal-sifiointimentelmiä. Kvantitatiivisen eli määrällisen tutkimuksen edellytys on, että tutkittavasta ilmiöstä on olemassa teorioita tai malleja. Sisäiset ja ulkoiset tekijät, jotka vaikuttavat ilmiöön, ovat tunnettuja kvantitatiivisessa tutkimuksessa. (Kananen 2012.)

Vertailevan tutkimuksen tunnuspiirteitä ovat luonnolliset vaihtelut, väliin tulevien muuttujien hallitsemattomuus, vähäinen teoreettinen perusta ja hypoteesit. Vertailevassa tutkimuksessa muuttujia on enemmän kuin kokeellisessa tutkimuksessa. Vertailevassa kvantitatiivisessa tutkimuksessa pyritään erojen osoittamiseen ja niitä voi olla useita. (Helakorpi 1999.)

4.2 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön aihe saatiin TYKS-SAPA – liikelaitoksen patologian yksiköltä syksyllä 2013. Tutkimuslupa (liite 1) opinnäytetyön toteuttamiseksi saatiin Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiriltä 22. lokakuuta 2013. Tutkimuksen empiirinen osuus aloitettiin joulukuussa 2013 ja saatiin päätökseen huhtikuussa 2014. Aineiston raportointi ja kirjoitusprosessi alkoi tammikuussa 2014 ja opinnäytetyö valmistui toukokuussa 2014. Tässä tutkimuksessa tutkimusympäristönä toimi Turun yliopistollisen keskussairaalan kliinisen patologian yksikkö. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat Sanna Virtanen Turun ammattikorkeakoulusta ja Turun yliopistollisen sairaalan solubiologi.

4.3 Tutkimusaineiston hankinta ja käsittely

Tässä tutkimuksessa näytemateriaalina käytettiin Turun yliopistollisen keskussairaalan patologian yksikön toimittamia luukudosta sisältäviä kovakudospaloja. Näytemateriaali kerättiin viideltä eri potilaalta ja käsiteltiin obduktioteknikon toimesta joulukuussa vuonna 2013. Obduktioteknikon paloittelemat kudospalat säilöttiin fiksatiiviin. Fiksatiivina käytettiin formaliinia, jolloin näytemateriaali pysyi tutkimuskelpoisena. Kovakudosnäytteitä fiksoitiin vähintään 2-4 vuorokautta formaliinissa niiden kovuuden ja sitkeyden vuoksi ennen dekalsifioinnin aloittamista. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 54 kovakudospalaa. Taulukossa 1 on esitetty olennaiset tiedot tutkimusaineiston alkuperästä.

Taulukko 1. Näytetiedot

| Näyttenumero | Näytteen pvm. | Sukupuoli | Ikä (v) | Näytteen laatu |
|--------------|---------------|-----------|---------|--------------------------------------|
| 1 | 3.12.2013 | Nainen | 69 | Lonkka (caput) |
| 2 | 26.11.2013 | Nainen | 69 | Lonkka (caput) |
| 3 | 8.10.2013 | Nainen | 61 | Kylkiluu |
| 4 | 6.7.2012 | Nainen | 59 | Rintalasta |
| 5a | 15.8.2013 | Mies | 16 | Humerus |
| 5b | 15.8.2013 | Mies | 16 | Humeruksen distaalipää (sis. rustoa) |

Dekalsifointiin käytettävät liuokset olivat patologian laboratorion toimittamia ja valmistamia lukuun ottamatta kaupallista Decalc-liuosta, joka oli valmistettu yksityisen tahon toimesta. EDTA-liuoksen valmistusohje löytyy liitteestä 4. Tutkimusaineisto käsiteltiin viikoilla 50/2013 ja 20/2014 Turun yliopistollisen keskussairaalan patologian yksikössä.

4.4 Tutkimuksen suoritus

Ennen dekalsifioinnin aloittamista näytteet punnittiin, kasetoitiin ja merkittiin näytetyypin, dekalsifiontilämpötilan sekä dekalsifointiliuoksen mukaan. Näytetyyppi merkittiin roomalaisin numeroin (I/II/III/IV/Va/Vb). Dekalsifiontilämpötilamerkinnot olivat RT, 37 tai 50, missä RT tarkoitti huoneenlämpöä ja numerot celsiusasteita. Dekalsifointiliuokset merkittiin niiden ensimmäisen kirjaimen mukaan (E/M/D).

Kaikki huoneenlämmössä dekalsifoidut näytteet olivat parafilmillä peitettyssä lasiastiassa magneettisekoituksessa koko käsittelyn ajan. Dekalsifointiliuoksen määrä oli noin 500 millilitraa riippumatta liuoksesta. Näytteiden dekalsifioitumista seurattiin neulatestein, ja niiden yhteydessä dekalsifointiliuokset yleensä vaihdettiin. EDTA-liuosta vaihdettiin käsittelyn aikana kuusi kertaa, muurahais-happo kerran sekä Decalc-liuos aina kun käsittely aloitettiin. Kaikki näytteet olivat dekalsifioinnin ajan kaseteissaan. Niin huoneenlämmössä kuin mikroaaltouunikäsitelystä olleita näytteitä liotettiin vedessä 5 minuuttia ennen ja jälkeen käsittelyn. Käsittelyiden välisen ajan näytteet olivat formaliinissa.

Tutkimuksen lämpökäsittelyyn käytettiin Milestonen KOS MM073-004 mikroaaltolaboratorioasemaa. Mikroaaltouunimenetelmään ja sen toimintaan sekä eri dekalsifointiliuoksiin perehdyttiin omatoimisesti ja ohjaajan avustuksella. Dekalsifiontilämpötila oli ohjelmoitu laitteeseen siten, että lämpötilan nousu +37 °C:een kesti 7 minuuttia kun taas +50 °C:een se kesti 9 minuuttia. Laitteen magneettisekoittajan nopeus oli 400 kierrosta minuutissa. Dekalsifointiliuoksen määrä oli aina 500 millilitraa. Näytteiden dekalsifioitumista seurattiin neulatestein aina käsittelyn päätyttyä.

Kun dekalsifioituminen oli valmis, tai kun katsottiin, ettei dekalsifointia tule enää jatkaa, näytteet kävivät läpi normaalin kudoskuljetusprosessin ennen kuin ne valettiin parafiiniblokeiksi.

Parafiiniblokki leikattiin Turun yliopistollisen keskussairaalan patologian yksikössä kokeneen ja aiheeseen syventyneen laboratoriohoitajan toimesta. Laborato-

riohoitaja teki myös leikkaamisen yhteydessä näytteistä leikkaavuuden arviointia, joka oli arvioitu asteikolla 0-3, jossa 0 tarkoitti sitä, ettei näytteen leikkaaminen onnistunut ja 3 sitä, että näyte leikkautui hyvin. Arviointilomakkeet löytyvät liitteestä 3.

Kun leikkeet olivat siirretty objektilaseille, ne värjättiin Hematoksyliini-Eosiini – värjäyksellä Sakuran Tissue-Tek Prisma -värjäysautomaatissa. Tämän jälkeen näytteet toimitettiin patologin arvioitavaksi. Ennen patologin arviointia kaikki objektilasit käytiin läpi valomikroskooppia käyttäen opinnäytetyöntekijöiden ja ohjaajan kanssa. Tämän jälkeen objektilaseja tarkasteltiin mikroskooppisesti yhdessä patologin kanssa. Patologi arvioi näytteiden kudismorfologian suullisesti ja kirjallisesti asteikolla 0-3, jossa 0 tarkoitti sitä, että kudos oli täysin vaurioitunut ja 3 sitä, että kudos oli moitteeton. Näytteiden kudismorfologian arviointilomake löytyy liitteestä 5. Näytteiden kudismorfologiassa arvioitiin luukudosta tai rustoa sekä luuydintä tai muita pehmytkudoksia. Patologin tekemän arvioinnin perusteella näytteistä otettiin valokuvat, joista ilmeni moitteeton kudismorfologia sekä täysin vaurioitunut kudismorfologia.

5 TUTKIMUSTULOKSET

5.1 Yleistä

Näytteiden dekalsifioitumista arvioitiin itsenäisesti suoritetuin fysikaalisin neulatestein. Neulatestejä suoritettiin aina jokaisen käsittelyn jälkeen jokaiselle kudospalalle.

5.2 EDTA RT

Huoneenlämmössä ja EDTA -liuoksessa dekalsifioitujen näytteiden käsittelyaika oli 8-96 vuorokautta. Taulukossa 2 on esitetty näytteiden painot ja dekalsifioimisajat. EDTA -liuoksen pH-tasoa ei seurattu tutkimuksen aikana ja EDTA-liuos vaihdettiin noin kahden viikon välein.

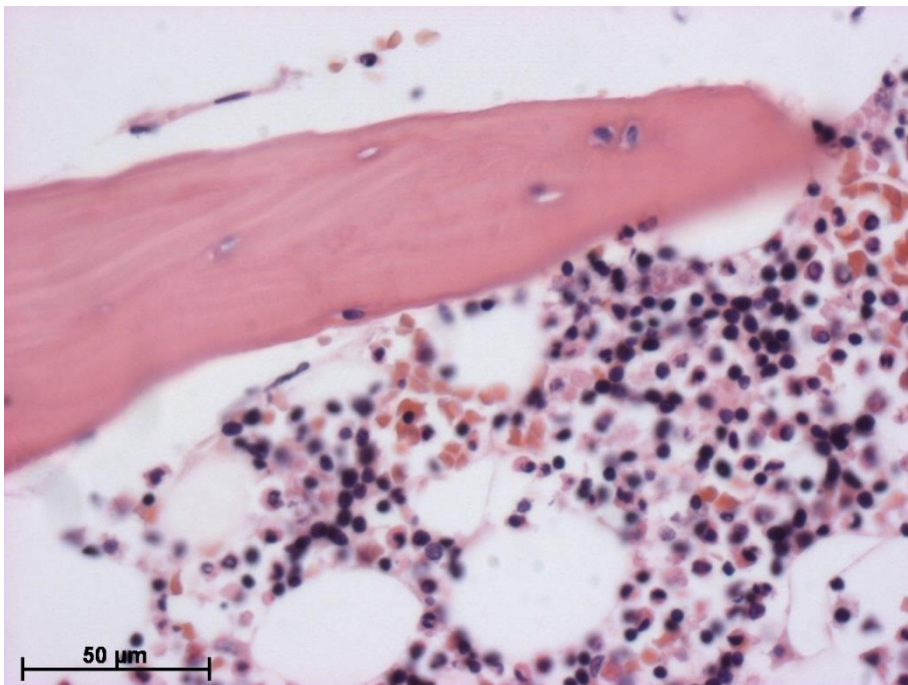
Taulukko 2. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot. (EDTA RT)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (vrk) |
|---------------|--------------------|------------------------------|
| I RT E | 1,3 | 96 |
| II RT E | 1,6 | 49 |
| III RT E | 0,4 | 8 |
| IV RT E | 1,2 | 82 |
| Va RT E | 0,9 | 96 |
| Vb RT E | 1,1 | 82 |

5.2.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu

Näytteet leikkautuivat Va RT E –näytettä lukuun ottamatta kaikki. Näytteiden leikkautuvuuden keskiarvoksi saatiin $(2+1+3+3+0+2):6= 1,8$ pistettä, joka tarkoittaa, että näytteet leikkautuivat kohtalaisesti.

Näytteiden kudismorfologia oli moitteetonta, paitsi näytteessä II RT E, jossa oli lieviä vaurioita niin kova- kuin pehmytkudoksissa. Kuva 1 on näytteestä IV RT E.



Kuva 1. HE-värjäys huoneenlämmössä EDTA-liuoksessa dekalsifoidulle näytteelle (40x).

5.3 EDTA +37 °C ja EDTA +50 °C

Sekä +37 °C:ssa että +50 °C:ssa EDTA – liuoksessa dekalsifoidut näytteet eivät dekalsifioituneet tutkimuksen aikana riittävästi, eikä niitä valettu parafiiniin. Taulukoissa 3 ja 4 on esitettyinä dekalsifiointiajat kyseisille näytteille sekä niiden painot.

Taulukko 3. Dekalsifointiajat ja näytteiden painot. (EDTA, +37 °C)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (h) |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| I RT 37 | 1,5 | 48,5 |
| II RT 37 | 2,4 | 48,5 |
| III RT 37 | 0,7 | 48,5 |
| IV RT 37 | 1,5 | 48,5 |
| Va RT 37 | 1,0 | 48,5 |
| Vb RT 37 | 1,0 | 48,5 |

Taulukko 4. Dekalsifointiajat ja näytteiden painot (EDTA, +50 °C)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (h) |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| I RT 50 | 2,9 | 27 |
| II RT 50 | 2,4 | 27 |
| III RT 50 | 0,6 | 27 |
| IV RT 50 | 1,7 | 27 |
| Va RT 50 | 0,8 | 27 |
| Vb RT 50 | 2,0 | 27 |

5.4 Muurahaishappo RT

Taulukko 5. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (Muurahaishappo, RT)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä (vrk) | dekalsifioitu |
|---------------|--------------------|-------------------|---------------|
| I RT M | 0,8 | 14 | |
| II RT M | 1,9 | 14 | |
| III RT M | 0,5 | 14 | |
| IV RT M | 1,6 | 14 | |
| Va RT M | 1,0 | 14 | |
| Vb RT M | 2,2 | 14 | |

5.4.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu

Näytteet leikkautuivat Va RT M –näytettä lukuun ottamatta kaikki. Keskiarvoksi saatiin $(2+1+2+1+0+2):6 = 1,3$ pistettä. Näytteet leikkaantuivat huonosti.

Näytteiden kudismorfologiassa oli vain lieviä vaurioita niin kova- kuin pehmytkudoksissakin.

5.5 Muurahaishappo +37 °C

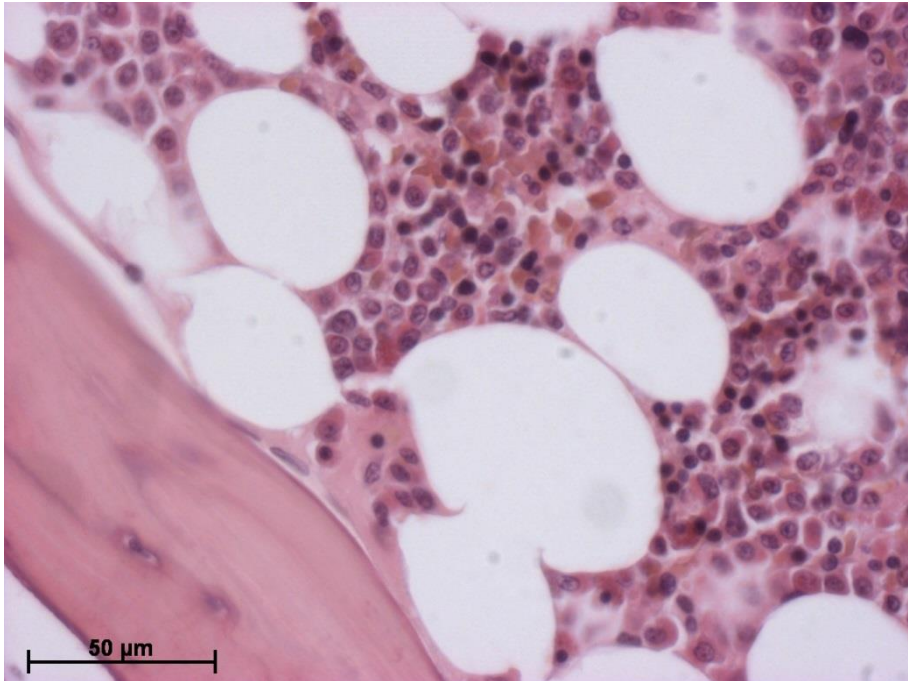
Taulukko 6. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (Muurahaishappo, +37 °C)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (h) |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| I 37 M | 0,8 | 16 |
| II 37 M | 2,0 | 16 |
| III 37 M | 0,8 | 16 |
| IV 37 M | 0,8 | 16 |
| Va 37 M | 0,9 | 16 |
| Vb 37 M | 1,3 | 16 |

5.5.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu

Näytteet leikkautuivat kaikki lukuun ottamatta Va 37 M –näytettä. Keskiarvoksi saatiin $(1+3+3+1+0+2):6= 1,7$ pistettä, joka tarkoittaa että näytteet leikkautuivat kohtalaisesti.

Näytteiden kudismorfologiassa oli lieviä vaurioita niin kova- kuin pehmytkudoksissakin. Kuva 2 on näytteestä IV 37 M.



Kuva 2. HE-värijäys mikroaaltouunimenetelmällä muurahaishapossa dekalsifioidulle näytteelle (+37 °C) (40x)

5.6 Muurahaishappo +50 °C

Taulukko 7. Dekalsifointiajat ja näytteiden painot (Muurahaishappo, +50 °C)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (h) |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| I 50 M | 1,0 | 8 |
| II 50 M | 1,8 | 3 |
| III 50 M | 0,5 | 3 |
| IV 50 M | 1,5 | 4 |
| Va 50 M | 0,9 | 8 |
| Vb 50 M | 1,1 | 6 |

5.6.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu

Näytteet leikkautuivat kaikki lukuun ottamatta Va 50 M -näytettä. Keskiarvoksi leikkautuvuudesta saatiin $(2+2+3+2+0+3):6=2$ pistettä. Näytteet leikkautuivat kohtalaisesti.

I 50 M – Vb 50 M-näytteiden laatu arvioitiin asteikolla 0-3. Näytteiden kudusmorfologiassa oli lieviä vaurioita.

5.7 DeCalc RT

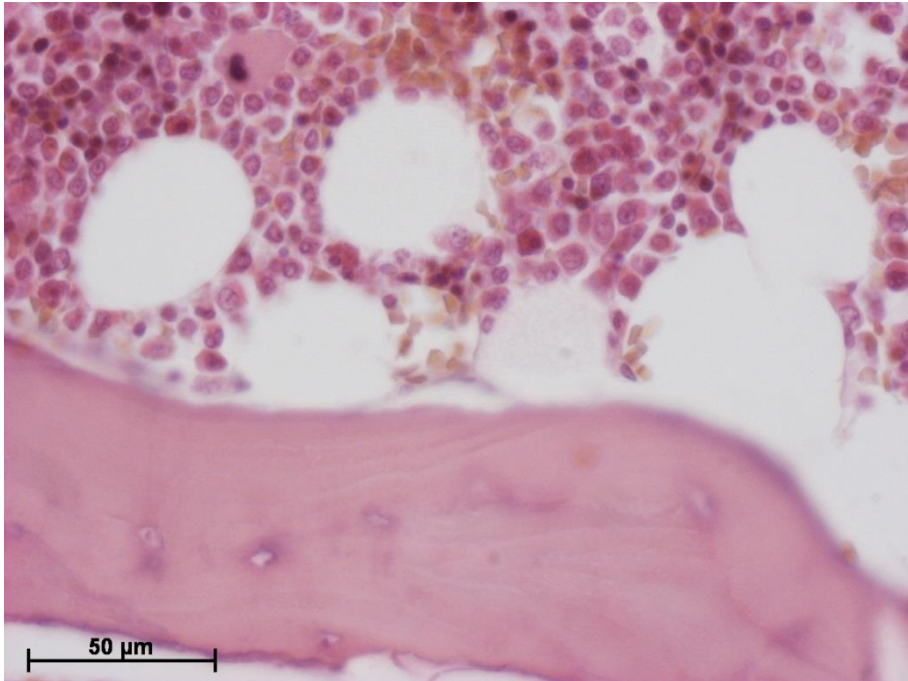
Taulukko 8. Dekalsifointiajat ja näytteiden painot (DeCalc, RT)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (h) |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| I RT D | 1,2 | 20 |
| II RT D | 1,6 | 13,5 |
| III RT D | 0,6 | 12,5 |
| IV RT D | 1,7 | 20 |
| Va RT D | 0,8 | 20 |
| Vb RT 50 | 1,6 | 13,5 |

5.7.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu

Näytteet leikkaantuivat kaikki lukuun ottamatta Va RT D –näytettä. Keskiarvoksi leikkautuvuudesta saatiin $(1+2+3+2+0+2):6= 1,7$ pistettä. Näytteet leikkautuivat kohtalaisesti.

Näytteiden kudusmorfologiassa oli kohtalaisia vaurioita niin kova- kuin pehmytkudoksissakin. III RT D –näytessä kovakudos oli täysin vaurioitunut kudusmorfologisesti tarkasteltuna. Kuva 3 on näytteestä IV RT D.



Kuva 3. HE-värjäys huoneenlämmössä DeCalc-suolahappoliuoksessa dekalsifoidulle näytteelle (40x)

5.8 DeCalc +37 °C

Taulukko 9. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (DeCalc, +37 °C)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (h) |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| I 37 D | 0,6 | 5,25 |
| II 37 D | 1,5 | 5,25 |
| III 37 D | 0,6 | 3,25 |
| IV 37 D | 1,1 | 5,25 |
| Va 37 D | 0,8 | 5,25 |
| Vb 37 D | 1,3 | 5,25 |

5.8.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu

Näytteet leikkaantuivat kaikki lukuun ottamatta Va 37 D –näytettä. Keskiarvoksi leikkautuvuudesta saatiin $(2+2+3+3+0+3):6= 2,2$ pistettä. Näytteet leikkautuivat kohtalaisesti.

Näytteiden kudismorfologiassa oli kohtalaisia vaurioita niin kova- kuin pehmytkudoksissakin tai kudokset olivat täysin vaurioituneet.

5.9 DeCalc +50 °C

Taulukko 10. Dekalsifiointiajat ja näytteiden painot (DeCalc, 50 °C)

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekalsifioitu (h) |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| I 50 D | 1,6 | 4,25 |
| II 50 D | 1,2 | 2,25 |
| III 50 D | 0,5 | 1,25 |
| IV 37 D | 1,3 | 3,25 |
| Va 37 D | 0,9 | 4,45 |
| Vb 37 D | 1,0 | 1,75 |

5.9.1 Leikkautuvuuden arviointi ja näytteiden laatu

Kaikki näytteet leikkautuivat ja keskiarvoksi leikkautuvuudesta saatiin $(3+3+3+2+1+2):6 = 2,3$ pistettä. Näytteet leikkautuivat kohtalaisesti.

Näytteiden kudismorfologia oli täysin vaurioitunut niin kova- kuin pehmytkudoksenkin osalta. Kuva 4 on näytteestä IV 37 D.



Kuva 4. HE-värijäys mikroaaltouunimenetelmällä DeCalc-suolahappoliuoksessa dekalsifoidulle näytteelle. (+50 °C) (40x)

6 POHDINTA

6.1 Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys

Tässä tutkimuksessa huomioitiin eettiset lähtökohdat noudattaen hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimuksessa noudatettiin rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta. Plagiointia ja siihen liittyvää luvaton lainaamista ei tutkimuksessa käytetty. Tutkimustuloksia ei sepitetty eikä niitä muunneltu. Toisten tutkijoiden osuutta ei myöskään vähätelty ja raportointi oli rehellistä ja virheetöntä. (Hirsijärvi ym. 2009.)

Tutkimuksessa käytettiin testikudoksena kovakudospaloja, joista puuttuivat tunnistetiedot. Tutkimuksessa ei käsitelty potilastietoja ja kovakudosnäytteiden alkuperä pysyi tuntemattomana. Näytteet numeroitiin erikseen tutkimusta varten, jotta ne tunnistettiin tutkimuksen aikana. Tutkimus suunniteltiin ja toteutettiin patologian laboratoriossa olevien menetelmä- ja työohjeita noudattaen.

6.2 Johtopäätökset

Tutkimuksen tavoitteena oli löytää nopea ja kudoksille hellävarainen dekalsifointimenetelmä Turun yliopistollisen keskussairaalan patologian laboratorion käyttöön. Tutkimuksessa vertailtiin kolmea eri dekalsifointiliuosta; EDTA, muurahaishappo ja Decalc-liuosta sekä tutkittiin miten mikroaaltokäsittely eri lämpötiloissa vaikuttaa dekalsifoinnin nopeuteen ja kudoksen laatuun. Tutkimuksen suorittaminen edellytti teorian ja työskentelyn erityisosaamista patologian laboratoriossa.

Leikkautuvuus ja näytteiden kudost morfologian säilyminen olivat ne kriteerit, joiden perusteella todettiin, että dekalsifointi muurahaishapolla +37 °C:ssa oli nopea ja kudoksille hellävarainen menetelmä ja soveltuu tulevaisuudessa hyvin kliniseen käyttöön patologian laboratoriossa. Menetelmä nopeuttaa diagnostiikkaa ja potilaan hoitopäätösten syntymistä patologian yksikössä. Dekalsifointi

muurahaishapolla +50 °C:ssa soveltuu dekalsifiointiajan puolesta myös hyvin kliiniseen käyttöön patologian laboratoriossa. Hapojen kyky vaurioittaa kudosta kasvaa lämpötilan kohotessa, joten alhaisempi lämpötila on aina parempi vaihtoehto kudostamorfologian kannalta.

Toisaalta näytteiden laadun arvioinnin perusteella EDTA-liuos oli hellävaraisin solumorfologian kannalta, mutta dekalsifiointiaika oli liian pitkä eikä tule soveltumaan tulevaisuudessa kliiniseen käyttöön patologian laboratoriossa. Huoneenlämmössä ja EDTA -liuoksessa dekalsifioitujen näytteiden käsittelyaika oli 8-96 vuorokautta. Suuri vaihtelu selittyy sillä, että näyte III RT E sisälsi erittäin vähän kovakudosta. DeCalc-liuoksella sen sijaan onnistuttiin nopeuttamaan näytteiden dekalsifioitumista, mutta näytteiden kudostamorfologia oli käsittelyn jälkeen pahasti vaurioitunut. Erityisesti dekalsifiointi DeCalc-liuoksessa +50 °C:ssa oli niin rajua, että tutkimuksessa käytetyt muoviset näytekasetitkin alkoivat hajota.

Sekä +37 °C:ssa että +50 °C:ssa EDTA -liuoksessa dekalsifioidut näytteet eivät dekalsifioituneet tutkimuksen aikana riittävästi, että niitä olisi kannattanut edes valaa parafiiniin, joten tältä osin tutkimustulokset jäivät vajaiksi.

Tutkimuksessa käytetyt luunpalat eivät olleet täysin samankokoisia johtuen siitä, ettei tarkkaan leikkaamiseen soveltuvaa laitetta ollut saatavilla. Tämä käy ilmi vertailtaessa saman näytteestä leikattujen näytepalojen painoeroja (liite 6). Tutkimustuloksia kokonaisuutena tarkasteltaessa, voidaan todeta, että näytepalojen kokoeroilla ei ollut suurta vaikutusta lopputuloksiin. Ainostaan näytepalat, joita käytettiin EDTA -liuoksessa +50 °C:ssa olivat suurempia, ja niin ollen palojen koko vaikutti todennäköisesti kyseisen sarjan dekalsifioitumisen epäonnistumiseen. Osa näytteistä todettiin parafiinileikkeittä leikattaessa keskeneräisiksi dekalsifioitumisen suhteen. Lisäksi on mainittava, että näytteiden paloitteluun käytetyt välineet eivät olleet tarkkaan ja täsmälliseen työhön soveltuvia. Muurahaishapossa ja huoneenlämmössä dekalsifioidut näytteet leikkaantuivat tutkimusten mukaan huonosti. Mainittakoon, että yksi näytteistä (Vb RT M) mureni leikkaamisen yhteydessä. Lisäksi kahdesta näytteestä (I RT M ja Vb RT M) irtosi kovat palat (liite 6).

6.3 Tutkimuksen hyödynnettävyys ja jatkotutkimusaiheet

Tämän tutkimuksen tulokset antavat hyödyllistä tietoa dekalsifointimenetelmien eroista ja näitä tuloksia voidaan hyödyntää kovakudosnäytteiden dekalsifoinnin nopeuttamiseen työelämässä. Tutkimuksessa käytetty mikroaaltouunimenetelmä +37 °C ja muurahaishappo todettiin käyttökelpoiseksi kovakudosnäytteiden dekalsifointimenetelmäksi. Menetelmä soveltuu hyvin kliiniseen käyttöön patologian laboratoriossa ja kyseinen menetelmä voidaan ottaa käyttöön Turun yliopistollisen keskussairaalan patologian laboratoriossa.

Jatkotutkimuksena olisi mahdollista immunohistokemiallisten värjäyksien avulla tutkia käyttöön otetun dekalsifointimenetelmän molekyyli-tason vaikutuksia luidoksessa.

6.4 Kiitokset

Näiden tulosten aikaansaamisessa korvaamaton apu ja tuki oli Turun yliopistollisen keskussairaalan solubiologi Veronica Fagerholmin panos ja osaaminen tutkimuksen toteuttamisessa.

LÄHTEET

Aho H. 1999. Histologiset menetelmät patologiassa. Turun yliopisto. Kliinis-teoreettinen laitos. Patologia. Turku.

Bancroft, J.D & Gamble, M. 2008. Theory and practice of histological techniques. Philadelphia: Churchill livingstone Elsevier.

Callis, G.M 2008. Tissue Processing. Theory and practice of histological techniques. China. British Library Cataloguing in Publication Data.

Dimenstein, I.B. 2012. Decalcification in Surgical Pathology. The Cutting Edge Journal Vol 2, No 3, 21-23.

Helakorpi, S. 1999. Opinnäytetyö ja tutkimustoiminta ammattikorkeakouluissa. Hämeenlinna: Hämeen ammattikorkeakoulu.

Helin, H. 2007. Nopeat kudostekniikat. Moodi-lehti nro.6. Helsinki: Labquality Oy.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Kananen J. 2012. Kehittämistutkimus opinnäytetyönä; Kehittämistutkimuksen kirjoittamisen käytännön opas. Tampere: Tampereen Yliopistopaino Oy – Juvenes Print.

Leppäluoto, J.; Kettunen, R.; Rintamäki, H.; Vakkuri, O.; Vierimaa, H & Lätti, S. 2013. Anatomia ja fysiologia. Rakenteesta toimintaan. 3., uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Mäkinen, M. 2012. Diagnostiset menetelmät. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. Helsinki: Duodecim.

Naukkarinen, A. 2000. Histologiset värjäykset. Moodi 4-5/2000. Kokkola: Art-Print.

Reagen Oy 2011. Weigert Van Gieson (WvG). Viitattu 27.9.2013
<http://www.reagen.fi/www/en/products/pdf/instructions/Weigert-Van-Gieson-Ver-1.0-ENG.pdf>.

Saranen, M. 2005. Kokemuksia nopeasta mikroalokudosprosessoinnista. Moodi-lehti nro.1. Helsinki: Labquality Oy.

Solunetti 2006. Hematoksyliini-eosiini, hematoksylin-eosin. Viitattu 26.9.2013
<http://www.solunetti.fi> > Histologia > Näytteenvalmistus > Värjäysmenetelmät

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. Lontoo: Churchill Livingstone Elsevier.

Sterchi, D.L. 2013. Bone. Teoksessa Suvarna,S.K; Layton, C & Bancroft, J.D. (toim.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Lontoo: Churchill Livingstone Elsevier.

Terveyskirjasto 2014. Osteoporoosi. Viitattu 28.4.2014
www.terveyskirjasto.fi > Lääkärikirja Duodecim > Yleissairauksia > Selkä, nivelet, jäsenet, luut > Luiden sairaudet > Osteoporoosi (luukato)

Tinling, S. P; Giberson, R. T. & Kullar, R. S. 2004. Microwave exposure increases bone demineralization rate independent of temperature. Journal of Microscopy Vol 215, No 3, 230-235.

Tutkimuslupa



Tyks-Sapa-liikelaitos/patologian palvelualue

11.10.2013

Päätös T186/6/11.10.13

TUTKIMUSLUPA (Toimintasääntö § 15)

Tutkimuksen numero: T186/6/11.10.13

Tutkimuksen nimi: **Kovakudosnäytteiden dekalsifointimenetelmien optimointi**

Tutkimuksen ajoitus: 2013

Vastuullinen tutkija: Veronica Fagerholm (Tyks-Sapa) ja Sanna Virtanen (TurkuAMK)
Opinnäytetyön suorittajat Mira Jalonen ja Juho Kurki (TurkuAMK)

Tutkittavien lukumäärä: 5

Myönnän luvan yllä mainittuun tutkimukseen VSSHP:ssä. Edellytän, että tutkimuksesta ei aiheudu haittaa yksiköiden normaalille toiminnalle eikä muita kustannuksia sairaalalle.

Benita Paloheina
ylihoitaja

JAKELU Vastuullinen tutkija
Opinnäytetyön tekijä
TurkuCRC
Hoitotyön toimisto

TYKS/patologian yksikkö

Koodi: Histologia, perusvärjäykset 1 b

Hematoksyliini-eosiinivärjäys

Konevärjäys parafiinileikkeille/ PH

Versio 6

Hyväksynyt: 8/9 1999 Heikki Aho

Päivitetty 15.1.2008/T.Aarikka

TYÖOHJE: HEMATOKSYLIINI-EOSIINIVÄRJÄYS (KONEVÄRJÄYS PARAFIINILEIKKEILLE), Delafieldin hematoksyliini**1. MENETELMÄN PERIAATE**

Hematoksyliini on luonnonväri, jonka hapetustuote hemateiini saadaan peittaamisen avulla kiinnittymään nukleiinihappoihin, jolloin erityisesti tuman kromatiini värjäytyy. Eosiini on hapan synteettinen punainen väriaine, jonka avulla hematoksyliini-eosiinimenetelmässä värjätään sytoplasma ja sidekudossäikeet tumavärjäyksen jälkeen.

2. LÄÄKETIETEELLINEN TAUSTA

Hematoksyliini-eosiinimenetelmä on perusvärjäys tutkittaessa ihmiskudosta. Se tuo hyvin esiin tumien sisärakenteen, joten se soveltuu erityisesti syövän histopatologiseen diagnostiikkaan.

3. NÄYTTEEN LAATU

Värjäys tehdään värjäysautomaatissa parafiinileikkeille.

4. TYÖN SUORITUS

Leikkaa puhtaille tai esikäsitellyille objektilaseille 4 µm:n parafiinileikkeitä, 1 - 6 leikettä/lasi näytteen koosta riippuen. Leikkeet kiinnitetään lasille lämpölevyllä (+ 60 °C

Värjäysautomaatti Tissue-Tek Prisma

| Askel | Asema | Liuos | Aika |
|--------------|--------------|----------------|-------------|
| 1 | D* | Drying Station | 5 min |
| 2 | 1 | Xsyleeni | 5 min |
| 3 | 2 | Xsyleeni | 5 min |
| 4 | 3 | Abs. alk. | 2 min |
| 5 | 9 | Abs. alk. | 2 min |
| 6 | 10 | 96 % | 2 min |
| 7 | 11 | 96 % | 2 min |
| 8 | W* | Vesi | 30 sek |
| 9 | 17 | Delafield | 18 min |
| 10 | W* | vesi | 10 min |
| 11 | 18 | HCl-alkoholi | 4 sek |
| 12 | W* | Vesi | 10 min |
| 13 | 19 | Eosin | 45 sek |
| 17 | 21 | Abs. alk. | 10sek |
| 18 | 22 | Abs. alk. | 10 sek |
| 19 | 23 | Xsyleeni | 5 min |
| 20 | 29 | Xsyleeni | 5 min |
| 21 | unloading | End Station*** | *** |

Päällystä objektilasit koneella tai yksitellen (lasit ovat tällöin ksyleenissä) sopivan kokoisella peitinlasilla. Käytä päällystämiseen esim. Mountex.

5. TULOS JA SEN TULKINTA

Tumat värjäytyvät sinisiksi ja sytoplasma sekä useimmat sidekudossäikeet värjäytyvät punaisiksi. Jos sytoplasmassa on runsaasti RNA:ta, värjäytyy se sinertäväksi.

6. VIRHELÄHTEET

Riittämättömät vesihuuhtelut heikentävät lopputulosta, samoin Delafieldin hematoksyliiniliuoksen suodattamatta jättäminen.

7. LAITTEET JA VÄLINEET

- Värjäysautomaatti Tissue-Tek Prisma
- Objektilaseja
- Peitinlaseja
- Suojakäsineet

8. REAGENSIT

- Ksyleeni
- 96 % etanoli
- Absoluuttinen etanoli
- Tislattu vesi
- HCl (Hydrochloric acid fuming, 37 %, Merck 317)

-Happoalkoholi: 5 ml väkevää suolahappoa (HCl) ja
500 ml 70 % alkoholia.
Valmista liuos viikottain tai useammin.

Hematoxyliinina käytetään ensisijassa kaupallista Delafieldin hematoxyliiniä.

-Kaupallinen hematoksyliini: Fluka 03971 (250ml) Hematoxylin solutin according to Delafield

-Delafieldin hematoksyliini: (labran tekemä) *Liuos I:* 120 g ammoniakkialunaa,
(Aluminium ammonium sulfate dodecahydrate,
 $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$, Merck, 1031) ja
1200 ml tislattua vettä.
Liuos II: 12 g hematoksyliiniä
(Hematoxylin, Certistain, Merck 15938) ja
75 ml abs. alkoholia.
Liuokset I ja II sekoitetaan.
Liuos saa olla avoimessa astiassa ikkunalaudalla 3 - 4 vuorokautta, jonka jälkeen se sekoitetaan, suodatetaan ja siihen lisätään

300 ml glyserolia ja 300 ml 96 % alkoholia.
Liuos saa olla vielä jonkin aikaa ilman kantta
(noin 1 viikko). Suodata käyttöliuos joka vii-
kon alussa.
Liuos säilyy n. vuoden.

-Eosiiniliuos Reagena 180072
-Mountex, Histolab AB 00841

9. VAROTOIMENPITEET

Käytä suojakäsineitä Tutustu ksyleenin käyttöturvallisuustiedotteeseen sekä hävittä-
misohjeisiin. HCl on väkevä happo. Käsittele sitä vetokaapissa.

10. KIRJALLISUUS

Bancroft, J. D. and Stevens, A. (eds.) 1990: Theory and practice of histological tech-
niques. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York.

Näytteiden leikkautuvuuden arviointi

0 = ei lainkaan

1 = huonosti

2 =kohtalaisesti

3= hyvin

| Näyte | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------|--------------|---|---|---|
| I RT E | | | x | |
| II RT E | | x | | |
| III RT E | | | | x |
| IV RT E | | | | x |
| Va RT E | x (ei lasia) | | | |
| Vb RT E | | | x | |

| Näyte | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------|---|---|---|---|
| I RT M | | | x | |
| II RT M | | x | | |
| III RT M | | | x | |
| IV RT M | | x | | |
| Va RT M | x | | | |
| Vb RT M | | | x | |

| Näyte | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------|---|---|---|---|
| I 37 M | | x | | |
| II 37 M | | | | x |
| III 37 M | | | | x |
| IV 37 M | | x | | |
| Va 37 M | x | | | |
| Vb 37 M | | | x | |

| Näyte | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------|---|---|---|---|
| I 50 M | | | x | |
| II 50 M | | | x | |
| III 50 M | | | | x |
| IV 50 M | | | x | |
| Va 50 M | x | | | |
| Vb 50 M | | | | x |

| Näyte | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------|---|---|---|---|
| I RT D | | x | | |
| II RT D | | | x | |
| III RT D | | | | x |
| IV RT D | | | x | |
| Va RT D | x | | | |
| Vb RT D | | | x | |

| Näyte | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------|---|---|---|---|
| I 37 D | | | x | |
| II 37 D | | | x | |
| III 37 D | | | | x |
| IV 37 D | | | | x |
| Va 37 D | x | | | |
| Vb 37 D | | | | x |

| Näyte | 0 | 1 | 2 | 3 |
|----------|---|---|---|---|
| I 50 D | | | | x |
| II 50 D | | | | x |
| III 50 D | | | | x |
| IV 50 D | | | x | |
| Va 50 D | | x | | |
| Vb 50 D | | | x | |

EDTA 5%-liuos, valmistusohje (5000 ml)

| | |
|---------------------------------|---------|
| EDTA-Titriplex III (Merck 8418) | 250 g |
| Sakkarooosi (BDH 27480) | 170 g |
| Aqua | 4500 ml |

Säädä pH 7,4 NaOH pelleteillä (noin 26 g) tai kylläisellä NaOH –liuoksella.

Aqua ad 5000 ml

Mitataan pH

Näytteiden kudismorfologian arviointi

- = Ei voida arvioida (kudosta ei löydy/kudos ei leikkaantunut)

0 = Kudos täysin vaurioitunut

1 = Kudoksessa kohtalaisia vaurioita

2 = Kudoksessa lieviä vaurioita

3 = Kudos moitteeton

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I RT E | 3 | 3 | |
| II RT E | 2 | 2 | |
| III RT E | 3 | 3 | |
| IV RT E | 3 | 3 | |
| Va RT E | - | - | |
| Vb RT E | 3 | 3 | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I 37 E | | | |
| II 37 E | | | |
| III 37 E | | | |
| IV 37 E | | | |
| Va 37 E | | | |
| Vb 37 E | | | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I 50 E | | | |
| II 50 E | | | |
| III 50 E | | | |
| IV 50 E | | | |
| Va 50 E | | | |
| Vb 50 E | | | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I RT M | 2 | 2 | |
| II RT M | 2 | 2 | |
| III RT M | 2 | 2 | |
| IV RT M | 2 | 2 | |
| Va RT M | - | - | |
| Vb RT M | 2 | 2 | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I 37 M | 2 | 2 | |
| II 37 M | 2 | 2 | |
| III 37 M | 2 | 2 | |
| IV 37 M | 2 | 2 | |
| Va 37 M | - | - | |
| Vb 37 M | 2 | 2 | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I 50 M | 2 | 2 | |
| II 50 M | 2 | 2 | |
| III 50 M | 2 | 2 | |
| IV 50 M | 2 | 2 | |
| Va 50 M | - | - | |
| Vb 50 M | 2 | 2 | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/Rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I RT D | 1 | 1 | |
| II RT D | 1 | 1 | |
| III RT D | 0 | 1 | |
| IV RT D | 1 | 1 | |
| Va RT D | - | - | |
| Vb RT D | 1 | 1 | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I 37 D | 0 | 1 | |
| II 37 D | 0 | 1 | |
| III 37 D | 0 | 1 | |
| IV 37 D | 1 | 1 | |
| Va 37 D | - | - | |
| Vb 37 D | 1 | 1 | |

- Kommentit:

| Näyte | Luu/rusto | Luuydin/muu pehmytkudos | Kommentit |
|----------|-----------|----------------------------|-----------|
| I 50 D | 0 | 0 | |
| II 50 D | 0 | 0 | |
| III 50 D | 0 | 0 | |
| IV 50 D | 0 | 0 | |
| Va 50 D | - | - | |
| Vb 50 D | 0 | 0 | |

- Kommentit:

Tutkimustulokset

| Näytteen nimi | Näytteen paino (g) | Näytettä dekal-sifioitu (h) | Näytteiden leikkautuvuus (0-3) | Näytteiden ku-dosmorfologia, Luu/Rusto (0-3) | Näytteiden ku-dosmorfologia, Luuydin/muu pehmytkudos (0-3) |
|---------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|--|
| I RT E | 1,3 | ~2300 (96 vrk) | 2 | 3 | 3 |
| I 37 E* | 1,5 | 48,5 | - | - | - |
| I 50 E* | 2,9 | 27 | - | - | - |
| I RT M | 0,8 | ~340 (14 vrk) | 2 | 2 | 2 |
| I 37 M | 0,8 | 16 | 1 | 2 | 2 |
| I 50 M | 1,0 | 8 | 2 | 2 | 2 |
| I RT D | 1,2 | 20 | 1 | 1 | 1 |
| I 37 D | 0,6 | 5,25 | 2 | 0 | 1 |
| I 50 D | 1,6 | 4,25 | 3 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| II RT E | 1,6 | ~1200 (49 vrk) | 1 | 2 | 2 |
| II 37 E* | 2,4 | 48,5 | - | - | - |
| II 50 E* | 2,4 | 27 | - | - | - |
| II RT M | 1,9 | ~340 (14 vrk) | 1 | 2 | 2 |
| II 37 M | 2,0 | 16 | 3 | 2 | 2 |
| II 50 M | 1,8 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| II RT D | 1,6 | 13,5 | 2 | 1 | 1 |
| II 37 D | 1,5 | 5,25 | 2 | 0 | 1 |
| II 50 D | 1,2 | 2,25 | 3 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| III RT E | 0,4 | ~190 (8 vrk) | 3 | 3 | 3 |
| III 37 E* | 0,7 | 48,5 | - | - | - |
| III 50 E* | 0,6 | 27 | - | - | - |
| III RT M | 0,5 | ~340 (14 vrk) | 2 | 2 | 2 |
| III 37 M | 0,8 | 16 | 3 | 2 | 2 |
| III 50 M | 0,5 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| III RT D | 0,6 | 12,5 | 3 | 0 | 1 |
| III 37 D | 0,6 | 3,25 | 3 | 0 | 1 |
| III 50 D | 0,5 | 1,25 | 3 | 0 | 0 |

| | | | | | |
|----------|-----|----------------|---|---|---|
| IV RT E | 1,2 | ~1900 (82 vrk) | 3 | 3 | 3 |
| IV 37 E* | 1,5 | 48,5 | - | - | - |
| IV 50 E* | 1,7 | 27 | - | - | - |
| IV RT M | 1,6 | ~340 (14 vrk) | 1 | 2 | 2 |
| IV 37 M | 0,8 | 16 | 1 | 2 | 2 |
| IV 50 M | 1,5 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| IV RT D | 1,7 | 20 | 2 | 1 | 1 |
| IV 37 D | 1,1 | 5,25 | 3 | 1 | 1 |
| IV 50 D | 1,3 | 3,25 | 2 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| Va RT E | 0,9 | ~2300 (96 vrk) | 0 | - | - |
| Va 37 E* | 1,0 | 48,5 | - | - | - |
| Va 50 E* | 0,8 | 27 | - | - | - |
| Va RT M | 1,0 | ~340 (14 vrk) | 0 | - | - |
| Va 37 M | 0,9 | 16 | 0 | - | - |
| Va 50 M | 0,9 | 8 | 0 | - | - |
| Va RT D | 0,8 | 20 | 0 | - | - |
| Va 37 D | 0,8 | 5,25 | 0 | - | - |
| Va 50 D | 0,9 | 4,25 | 1 | - | - |
| | | | | | |
| Vb RT E | 1,1 | ~1900 (82 vrk) | 2 | 3 | 3 |
| Vb 37 E* | 1,0 | 48,5 | - | - | - |
| Vb 50 E* | 2,0 | 27 | - | - | - |
| Vb RT M | 2,2 | ~340 (14 vrk) | 2 | 2 | 2 |
| Vb 37 M | 1,3 | 16 | 2 | 2 | 2 |
| Vb 50 M | 1,1 | 6 | 3 | 2 | 2 |
| Vb RT D | 1,6 | 13,5 | 2 | 1 | 1 |
| Vb 37 D | 1,3 | 5,25 | 3 | 1 | 1 |
| Vb 50 D | 1,0 | 1,75 | 2 | 0 | 0 |