



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

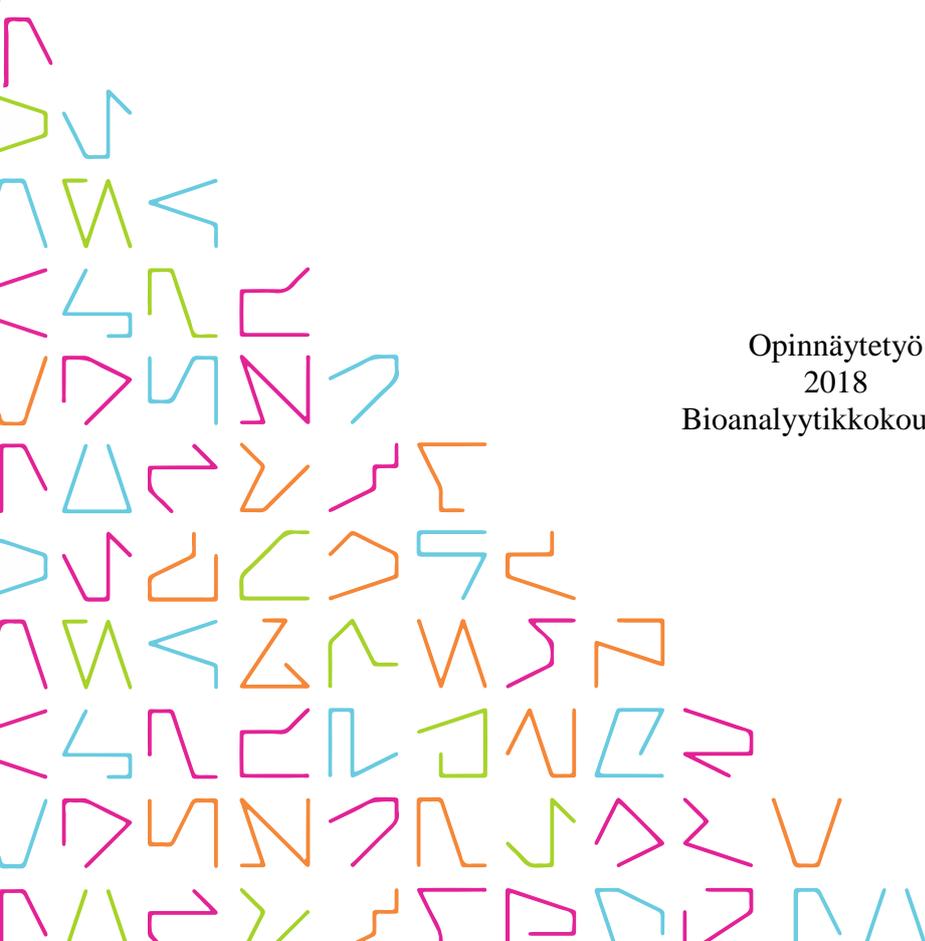
MAYERIN JA COLEN HEMATOKSYLIINIEN VERTAILU HEMATOKSYLIINI-EOSIINIVÄR- JÄYKSESSÄ

Minna Laamanen

Pauliina Ruotsalainen

Opinnäytetyö
2018

Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus
15BA

MINNA LAAMANEN & PAULIINA RUOTSALAINEN:

Mayerin ja Colen hematoksyliinien vertailu hematoksyliini-eosiinivärjyksessä

Opinnäytetyö 44 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Elokuu 2018

Histologisia näytteitä eli kudospäätteitä käytetään klinisen patologian tutkimuksissa potilaan solujen ja kudosten rakennemuutosten selvittämiseksi. Yleisimmät histologiset tutkimukset perustuvat värjättyjen kudospäätteiden tarkasteluun mikroskoopilla. Patologian laboratoriossa kudospäyte käy läpi esikäsittelyprosessin, jonka jälkeen objektilaseille kiinnitetyt leikkeet visualisoidaan erilaisten värjäysten avulla.

Hematoksyliini-eosiinivärjäys on yleisin histologisten näytteiden värjäämiseen käytetty menetelmä. Siinä hematoksyliini värjää solujen tumat siniseksi ja eosini sytoplasman ja muun taustan punaiseksi. Hematoksyliinistä on käytössä useita eri versioita, joista eräs on Colen hematoksyliini. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten Colen hematoksyliini värjää kudospäätteet verrattuna yleisemmin käytettyyn Mayerin hematoksyliiniin. Tavoitteena oli tehdä Colen hematoksyliinille värjäytymistulosten arviointi.

Opinnäytetyön aihe saatiin suomalaiselta kemianalan yritykseltä Reagena Oy:ltä, joka valmistaa Colen hematoksyliiniä erälle asiakkaalleen tilauksesta. Toimeksiantaja tarvitsi Colen ja Mayerin hematoksyliinien vertailun voidakseen hyväksyttää Colen hematoksyliinin viralliseksi in vitro –diagnostiikkatuotteeksi.

Menetelmänä käytettiin kokeellista kvantitatiivista tutkimusta. Patologian laboratoriosta saadusta monikudospäätteestä leikattiin leikkeet objektilaseille ja värjättiin rinnakkain Colen ja Mayerin hematoksyliineillä. Värjäykset tehtiin käsin ja molemmissa värjäyksissä käytettiin samaa värjäysohjetta. Värjäytymistulosten arviointia varten laadittiin kyselylomake, jonka avulla patologian laboratorioissa työskentelevät solubiologit arvioivat värjäyksiä numeerisesti ja sanallisesti. Arvioinnissa vertailtiin värjäytymiseroja eri kudosten välillä eri ominaisuuksien kannalta. Arvioitavat kudokset olivat tonsilla eli nielurisa, appendix eli umpilisäke, munuainen, iho, maksa, haima ja istukka. Vertailtavat ominaisuudet olivat kudoksen rakenteen erottuminen, tuman rakenteiden erottuminen, tumien ja muun kudoksen välinen kontrasti sekä värjäyksen soveltuvuus kudoksen tarkasteluun.

Tuloksissa korostuu jonkin verran värjäysohjeen optimaalisuus Colen hematoksyliinille. Eroja värjäytyvyydessä on myös eri kudosten välillä. Toisille kudoksille Mayerin hematoksyliini soveltui käytetyllä ohjeella värjätessä paremmin ja toisille taas Colen hematoksyliini. Molemmilla hematoksyliineillä värjäytymistulosten keskiarvot olivat kuitenkin samansuuntaiset. Johtopäätöksenä voidaan todeta, että Colen hematoksyliini soveltuu hyvin tutkimuksessa tarkasteltujen kudosten värjäämiseen.

Asiasanat: patologia, histologia, hematoksyliini, hematoksyliini-eosiinivärjäys, vertailu

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

MINNA LAAMANEN & PAULIINA RUOTSALAINEN

Comparison of Mayer's and Cole's Hematoxylin in Hematoxylin and Eosin Staining

Bachelor's thesis 44 pages, appendices 2 pages
August 2018

In clinical histopathology tissue samples are used to reveal structural alterations of patient's cells and tissues by means of light microscopy. In pathology laboratory tissue samples undergo a histology procedure, after which they are visualised using various staining methods.

The hematoxylin and eosin stain is the most widely used method for staining histological samples. The hematoxylin stains the cell nuclei blue and the eosin stains cell cytoplasm and the rest of the matrix red. There are various versions of hematoxylin, one of which is the Cole's hematoxylin. The purpose of this study was to examine how Cole's hematoxylin stains tissue samples compared to the more widely used Mayer's hematoxylin. The objective was to produce an evaluation of staining results for Cole's hematoxylin.

The topic for this thesis was received from a Finnish chemistry company Reagen Oy. They required the evaluation of staining results with Cole's hematoxylin to be able to get Cole's hematoxylin approved as an in vitro diagnostic medical device.

The method applied was an experimental quantitative study. A multitissue block was sectioned on object slides and stained using Cole's and Mayer's hematoxylin in parallel. Staining was performed manually, and the same staining protocol was followed in both stainings. Differences in staining results were compared between different tissues and features by two cell biologists. The tissues evaluated were tonsil, appendix, kidney, skin, liver, pancreas and placenta. The features evaluated were the distinctiveness of the tissue structure, the distinctiveness of the structures of the cell nuclei, the contrast between the nuclei and the rest of the tissue and the applicability of the staining method in the process of examining the tissue.

The optimality of the staining protocol for Cole's hematoxylin is somewhat shown in results. Mayer's hematoxylin was better suited for some tissues and Cole's hematoxylin for other. However, the averages of evaluations were similar. In conclusion it can be said that Cole's hematoxylin is well suited for staining the tissues examined in this study.

Key words: pathology, histology, hematoxylin, hematoxylin-eosin staining, comparison

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	HISTOLOGINEN LABORATORIOPROSESSI.....	8
2.1	Kudostutkimukset	8
2.2	Kudosnäytteiden käsittely ennen värjäystä.....	9
2.2.1	Näytteiden fiksaatio	9
2.2.2	Kudoskuljetus.....	10
2.2.3	Kudosnäytteiden valaminen	11
2.2.4	Kudosnäytteiden leikkaaminen	12
2.3	Kudosnäytteiden värjääminen.....	13
3	HEMATOKSYLIINI-EOSIINIVÄRJÄYS	15
3.1	Hematoksyliini	16
3.2	Eosiini	17
3.3	Värjäysprosessi hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä	18
3.4	Värjäytymiseen vaikuttavat tekijät hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä .	19
4	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	21
5	KOKEELLINEN KVANTITATIIVINEN TUTKIMUS	22
6	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	23
6.1	Näyte	23
6.2	Näytteiden värjääminen	23
6.3	Arviointilomakkeen laatiminen	24
6.4	Aineiston käsittely	25
7	TULOKSET	27
7.1	Solujen värjäytyminen Mayerin hematoksyliinillä HE-värjäyksessä	27
7.2	Solujen värjäytyminen Colen hematoksyliinillä HE-värjäyksessä.....	28
7.3	Esimerkkikuvia värjäyksistä	29
7.4	Tulosten yhteenveto	34
8	POHDINTA.....	35
8.1	Tutkimuksen luotettavuus.....	35
8.2	Tutkimuksen eettisyys	35
8.3	Opinnäytetyöprosessi	36
8.4	Tulosten tarkastelu	37
8.5	Johtopäätökset ja jatkotutkimusaiheet	39
	LÄHTEET.....	40
	LIITTEET	43
	Liite 1 Arviointilomake Colen hematoksyliinillä värjäytyille näytteille.....	43

Liite 2 Arviointilomake Mayerin hematoksyliinillä värjätyille näytteille..... 44

1 JOHDANTO

Histologia eli kudospoppi tarkoittaa oppia kudosten rakenteesta ja toiminnasta sekä kudosten tutkimusta pääasiassa mikroskooppisin ja kemiallisin keinoin (Lääketieteen sanasto 2018a). Kudostutkimusten avulla voidaan diagnosoida erilaisia muutoksia ja saada potilaan hoitoon tarvittavaa tietoa (Mäkinen 2012, 1125–1126). Jotta kudospoppeja voitaisiin tarkastella mikroskoopilla, ne on käsiteltävä ja värjättävä patologian laboratoriossa. Värjäyksen avulla kudoksen eri rakenteet saadaan näkyviin ja niitä voidaan arvioida. Yleisimmin histologisten näytteiden värjäämiseen käytetty menetelmä on hematoksyliini-eosiinivärjäys, jossa hematoksyliini värjää solujen tumat sinisiksi tai sinimustiksi ja eosini taustan punaisen eri sävyillä. (Orchard & Nation 2012, 34–35.)

Hematoksyliinistä on käytössä useita eri versioita (Horobin & Bancroft 1998, 89). Eräs versio hematoksyliinistä on Colen hematoksyliini. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, miten Colen hematoksyliini värjää kudospoppeja verrattuna yleisemmin käytettyyn Mayerin hematoksyliiniin. Menetelmänä käytämme kokeellista kvantitatiivista tutkimusta, jonka aineisto kerätään arviointilomakkeen avulla patologian laboratoriossa työskenteleviltä solubiologeilta. Aineisto käsitellään laskemalla vastauksista kunkin kysymyksen osalta keskiarvo sekä minimi- ja maksimiarvo.

Opinnäytetyön tavoitteena on tehdä Colen hematoksyliinille värjäytymistulosten arviointi. Saimme opinnäytetyön aiheen kemianalan yritykseltä Reagena Oy:ltä, joka valmistaa Colen hematoksyliiniä asiakkaalleen tilauksesta. Värjäytymistulosten arviointia tarvitaan, jotta Reagena Oy voisi hyväksyttää Colen hematoksyliinin viralliseksi in vitro – diagnostiikkatuotteeksi eli IVD-tuotteeksi ja vapauttaa väriaineen yleiseen myyntiin.

Reagena Oy on suomalainen yritys, joka kehittää, valmistaa ja myy tuotteita muun muassa klinisiin laboratorioihin, diagnostiikkayrityksiin, yliopistoihin ja tutkimuslaitoksiin, teollisuuden laboratorioihin ja prosesseihin sekä lääketeollisuuteen ja apteekkeihin (Reagena Oy 2018a). Yritys tekee myös yhteistyötä yliopistojen ja tutkimuslaitosten kanssa useissa maissa (Reagena Oy 2018b).

Lyhenne IVD tulee sanoista In vitro -diagnostiikka, jolla tarkoitetaan ei-invasiivisia, elimistön ulkopuolella verestä, muista kehon nesteistä tai kudoksista tehtäviä testejä. In vitro -diagnostiikan avulla voidaan saada tietoa potilaan terveydentilasta, ja se onkin tärkeä osa kliinistä päätöksentekoa kaikilla lääketieteen aloilla. IVD-testit ovat tärkeässä roolissa, kun pyritään parantamaan terveydenhoidon laatua näyttöön perustuen. (Roche Diagnostics Oy 2017.)

Valmistajan pitää antaa tuotteelle IVD-määritelmän mukainen käyttötarkoitus. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa 2017/746 IVD-tuote määritellään seuraavasti:

”in vitro -diagnostiikkaan tarkoitettulla lääkinällisellä laitteella tarkoitetaan lääkinällistä laitetta, joka on reagenssi, reagenssituote, kalibraattori, vertailumateriaali, diagnostiikkasarja, instrumentti, laite, laitteiston osa, ohjelmisto tai järjestelmä, jota käytetään joko yksin tai yhdessä muiden kanssa ja jonka valmistaja on tarkoittanut käytettäväksi ihmiskehon ulkopuolella (in vitro) suoritettavissa tutkimuksissa, joiden yksinomaisena tai pääasiallisena tarkoituksena on saada ihmiskehosta otettujen näytteiden, myös veren ja kudosten luovutusten, perusteella tietoa yhdestä tai useammasta seuraavista:

- a. fysiologisesta tai patologisesta toiminnosta tai tilasta;
- b. synnynnäisestä fyysisestä vammasta tai älyllisestä kehitysvammasta;
- c. alttiudesta sairaudelle tai taudille;
- d. turvallisuuden ja yhteensopivuuden määrittämiseksi mahdollisten vastaanottajien kannalta;
- e. hoitovasteen tai -reaktioiden ennustamiseksi;
- f. hoitotoimenpiteiden määrittelemiseksi tai tarkkailemiseksi.”

Suomessa Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto, Valvira, valvoo terveydenhuollon laitteiden ja tarvikkeiden asianmukaisuutta, mukaan lukien IVD-laitteita ja -tuotteita (Ståhlberg 2015, 20).

2 HISTOLOGINEN LABORATORIOPROSESSI

2.1 Kudostutkimukset

Kudoksista otetaan koepaloja erilaisten muutosten diagnosoimiseksi silloin, kun pyritään tekemään valintoja potilaan jatkohoidon tai operatiivisen hoidon suhteen. Kudostutkimuksia voidaan tehdä hyvin erilaisista näytteistä. Tutkittava kudoksenäyte voi olla vain muutaman millimetrin mittainen pala tai kokonainen elin, kuten rinta tai munuainen. Pieniä operatiivisia näytteitä ovat muun muassa luomet ja lipoomat sekä yleisimmät kirurgisesti poistetut elimet, kuten sappirakko tai umpilisäke. Suuria operatiivisia näytteitä ovat kokonaiset elimet tai elinten osat sekä elinryhmät, joita poistetaan sairauden vuoksi. (Mäkinen 2012, 1125–1126.) Myös lääketieteellisissä ja oikeuslääketieteellisissä ruumiinavauksissa otetaan vainajasta kudoksenäytteitä histologiseen tutkimukseen (Mäkinen & Karhunen 2012a, 1165). Ruumiinavauksen ja siihen liittyvien histologisten ja joskus myös mikrobiologisten tutkimusten perusteella patologi antaa lähettäneelle lääkärille ruumiinavauskertomuksen ja siihen liittyvät diagnoosit (Mäkinen & Karhunen 2012b, 1165).

Patologian laboratorioon lähetteen kanssa saapuvista näytteistä annetaan patologisanatomisen lausunto ja –diagnoosi (PAD), jonka avulla hoitava lääkäri saa hoitoon tarvitsemansa tiedot. Lausunnossa on kuvattu näyte sekä pienten näytteiden kohdalla kerrottu koepalojen lukumäärä ja arvioitu näytteen edustavuutta. Suuremmissa näytteissä on tärkeää valokuvata ja sanallisesti kuvailla makroskooppiset löydökset sekä kertoa ja merkitä näytteenottokohdat, jotta näytteen esikäsittelyvaiheesta jää dokumentti. Patologisanatomisessa diagnoosissa kuvaillaan histopatologinen muutos, jonka luonteesta kuvailun tarkkuus riippuu. Jos kyseessä on kasvainmuutos, lausunnosta on käytävä ilmi esimerkiksi kasvaintyyppi, hyvän- tai pahanlaatuisuus, pahanlaatuisen kasvaimen erilaistumisaste, suhde ympärillä oleviin kudoksiin ja poistomarginaalit. Lausunnon erotusdiagnostinen pohdinta antaa usein lisätietoa hoitavalle lääkärille. (Mäkinen 2012, 1130.)

2.2 Kudosnäytteiden käsittely ennen värjäystä

Patologian laboratorioon saapuvien rutiininäytteiden käsittely vie yleensä useita päiviä aikaa. Kudosten käsittely kestää laboratoriossa useimmiten vähintään 3–5 päivää. (Mäkinen 2012, 1127.) Poikkeuksena ovat pikatutkimuksena kudoksista tehtävät jääleikkeet, joita saatetaan ottaa kirurgisen toimenpiteen aikana ja joista saatavat tulokset vaikuttavat välittömästi jatko-operaatioon. Jääleikenäyte on valmis 15–25 minuutissa näytteen saapumisesta. (Mäkinen 2012, 1126.) Tämä opinnäytetyö käsittelee formaliinifiksoitujen kudosten hematoksyliini-eosiinivärjäyksiä, joten jääleikkeisiin ei ole tarkoitus perehtyä tarkemmin.

2.2.1 Näytteiden fiksaatio

Fiksaatio eli kudosnäytteiden esikäsittely tapahtuu mieluiten välittömästi kudospalan irrottamisen jälkeen, mikäli kudospalaa ei saada toimitettua heti laboratorioon. Sen tarkoituksena on estää kudoksen hajoaminen. Elävässä kudoksessa solut vastaanottavat jatkuvasti happea ja ravintoa ja niistä poistuu kuona-aineita ja aineenvaihduntatuotteita. Potilaasta irrottamisen jälkeen nämä prosessit pysähtyvät ja solun rakenteet, kuten rasvat, proteiinit, sokerit ja nukleiinihapot alkavat vähitellen hajota. Solurakenteiden hajoaminen eli autolyysi huonontaa kudosten värjäytyvyyttä hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä. Happamien rakenteiden hajotessa hematoksyliini ei tartu näytteeseen, mutta eosini värjää sytoplasman korostuneesti. Ajan kuluessa fiksoimattomassa kudoksessa alkaa myös tapahtua bakteerien, virusten ja sienien aiheuttamaa rakenteiden hajoamista. (Orchard & Nation 2012, 87.)

Fiksaatio voidaan suorittaa joko jäädyttämällä kudospala tai käyttämällä kemiallista fiksaatiivia, joka säilöö kudoksen rakenteen mahdollisimman täydellisesti siinä kunnossa, missä se on näytteenottohetkellä. Fiksaatioliuksella voidaan estää solujen aineenvaihdunta, entsyymitoiminta ja autolyysi sekä tuhota kudoksesta mikrobeja. Fiksaatio myös kovettaa kudoksen solukkoa. (Ross & Wojciech 2011, 2.)

Fiksatiiveja on olemassa erilaisia eri käyttötarkoituksiin. Histopatologisissa tutkimuksissa käytetyin fiksaatiivi on formaliini. (Orchard & Nation 2012, 92.) Formaliini on for-

maldehydin 37–40 % vesiliuos, jota voidaan käyttää erilaisina laimennoksina puskuriliuosten ja muiden lisäaineiden kanssa kudospalojen fiksaatioon. Rutiinivärjäyksissä käytetään yleisimmin 10 % formaliiniliuosta, jossa pH on säädetty puskuriliuoksen avulla neutraaliksi. Kudosnäytteen formaliinifiksaatioissa on huomioitava fiksatiivin tilavuus suhteessa näytteen kokoon. Yleensä suositellaan 20 kertaa näytteen vetoista fiksatiivimäärää, tosin tämä ei ole aina mahdollista suurten kudospalojen tai kokonaisten elinten kohdalla. (Orchard & Nation 2012, 93.)

Formaliini säilyttää hyvin kudoksen perusrakenteen, joten se soveltuu hyvin näytteiden HE-värjäykseen. Formaliini ei kuitenkaan sovellu kaikkiin värjäyksiin, sillä vaikka se säilyttää solujen perusrakenteen hyvin, sillä ei saada säilytettyä aivan kaikkia rakenteita, kuten esimerkiksi solukalvoja. (Ross & Wojciech 2011, 2.)

Kudosten fiksaatioon vaikuttavat useat tekijät. Suuret kudokset fiksoituvat hitaammin kuin pienet biopsiat, sillä fiksatiivin leviäminen kauttaaltaan isoon kudospalaan kestää kauemmin kuin pieneen. Lämpö, fiksatiivin konsentraatio ja riittävä fiksatiivin määrä suhteessa näytteen kokoon nopeuttaa fiksatiivin imeytymistä kudokseen. pH-puskuri hidastaa preparaatin fiksoitumista, mutta se on formaliinia käytettäessä välttämätöntä, jotta kudoksessa ei pääse muodostumaan väripigmenttejä happaman formaliinin reagoidessa kudoksen kanssa. Fiksatiivin osmolaliteetin tulisi vastata kudoksen osmolaliteettia, jotta kudoksesta ei pääse kutistumaan tai turpoamaan. Näytteiden tulisi olla fiksatiivissa myös riittävän kauan, jotta se imeytyy kudokseen läpikotaisin. (Orchard & Nation 2012, 93.)

2.2.2 Kudoskuljetus

Patologi tai kudosnäytteiden dissekointiin koulutettu bioanalyttikko tarkastaa silmämääräisesti patologian laboratorioon saapuvat suurehkot näytteet, kuten luomet ja niitä suuremmat kirurgiset näytteet ennen muuta käsittelyä laboratoriossa. Tarkastelun yhteydessä näytteet dissekoidaan eli pilkkotaan. Dissekoinnissa preparaatista valikoidaan kliinisesti merkityksellinen ja edustava osa jatkokäsitteltäväksi. Pienemmät biopsiat tutkitaan yleensä kokonaisuudessaan. Näyte myös valokuvataan tai piirretään ja siitä tehdään mahdollisimman tarkka kirjallinen kuvaus. (Mäkinen 2012, 1127–1128.)

Valikoidut kudospalat asetellaan näytekasetteihin ja ne käyvät läpi niin sanotun kuduskuljetuksen automatisoidussa kuduskuljettimessa. Tässä prosessissa näytteistä poistetaan vesi ja rasva ja kudokseen imeytetään parafiinia, jolloin pehmeiden kudosten rakenteet saadaan kovettumaan. Parafiinikäsittely myös mahdollistaa näytteiden pitkän säilyvyyden. (Mäkinen 2012, 1128.) Kuduskuljetuksen ensimmäisessä vaiheessa kudospala pestään ja siitä poistetaan vesi nousevalla alkoholisarjalla. Veden huolellinen poistaminen on tärkeää, jotta parafiini saadaan imeytymään kudokseen. Seuraavassa vaiheessa näyte kirkastetaan eli siitä poistetaan alkoholi sopivan liuottimen avulla. (Ross & Wojciech 2011, 2.) Käytetyn liuottimen tulee liueta sekä alkoholiin että parafiiniin, jotta se poistaa kudoksesta alkoholin sekä mahdollistaa parafiinin imeytymisen. Yleisimmin kuduskuljetuksessa käytetään kirkastusaineena ksyleeniä. Ksyleeni kirkastaa kudosta lisäämällä sen läpikuultavuutta, mutta se myös tekee kudoksesta kovemman ja hauraamman kuin jotkin vaihtoehtoiset kirkastusaineet. Kuduskuljetuksen viimeisessä vaiheessa kudospala kyllästetään kokonaan parafiinilla. Kuduskuljetus vie aikaa useita tunteja. Se suoritetaan yleensä yön aikana ja kuljettimessa on useita näytekasetteja samanaikaisesti käsittelyssä. (Orchard & Nation 2012, 103–104.)

2.2.3 Kudosnäytteiden valaminen

Kuduskuljetusprosessin jälkeen parafiinilla kyllästetyt kudosnäytteet valetaan parafiiniin. Kudosnäyte nostetaan kasetista sopivan kokoiseen valumuottiin, johon lasketaan valulaitteesta sulaa parafiinia. Muotti nostetaan kylmälevylle ja kudosnäytettä painetaan kevyesti muotin pohjaa vasten. Näytteen kasetista irrotetaan näytenumeron sisältävä kansi ja se asetetaan muotin päälle. Kun valettu blokki on jäähtynyt kylmälevyllä, muotti voidaan irrottaa.

Valuvaiheessa näyte on orientoitava eli aseteltava kasettiin oikean suuntaisesti. Oikeanlainen orientointi on ratkaisevan tärkeää, jotta kudoksen morfologia saadaan esiin halutulla tavalla. Erityisen tärkeää orientointi on esimerkiksi ihonäytteiden ja pienten gastroskopianäytteiden valamisessa. (Nowacek & Kiernan 2010, 151.)

2.2.4 Kudosnäytteiden leikkaaminen

Jäähtyneestä, kudospalan sisältävästä parafiinista, ns. parafiiniblokista, voidaan mikrotomilla leikata ohuita, 2–5 mikrometrin paksuisia leikkeitä värjäystä varten (Mäkinen 2012, 1128). Parafiiniblokkia trimmataan, kunnes kudosnäyte saadaan kokonaisuudessaan edustavasti esiin. Kudosnäytteitä leikataan nykyään useimmiten rotaatiomikrotomin avulla, mutta liukumikrotomeja käytetään myös edelleen (Kiernan 1999, 1–2). Rotaatiomikrotomissa veitsi on kiinnitetty tiukasti paikoilleen ja kudusblokkia liikutetaan pystysuorassa terää vasten. Liukumikrotomissa järjestys on päinvastainen: Kudusblokki on kiinnitetty paikoilleen ja veistä liikutetaan vaakatasossa blokkiin nähden.

Vesiliukumikrotomi eroaa tavanomaisesta rotaatiomikrotomista siten, että vesiliukumikrotomissa on integroituna vesiliuku ja lämminvesihaude. Leike ohjautuu suoraan veitseltä vesiliukuhihnalle. Vesi suoristaa leikettä ja liuku kuljettaa sen suoraan lämminvesihauteeseen (n. 40–50 °C), jossa parafiini hieman sulaa ja leike oikenee rypyistä. Altaasta leike poimitaan objektilasille. Objektilasin ja leikkeen väliin ei saa jäädä ilmakuplia, sillä silloin leike ei välttämättä kiinnity kunnolla lasille ja saattaa irrota värjäysprosessissa. Ilmakuplia voi poistaa ravistelemalla lasia ja kuivattamalla sitä pystyasennossa, jotta vesi valuu pois leikkeen ja lasin välistä. Leike siirretään lopuksi lämpölevylle kiinnittymään noin 20 minuutiksi.

Tavanomaisella rotaatiomikrotomilla leikattaessa kylmä vesi ja lämmin vesi ovat erillisissä altaissa. Leike on siirrettävä ensin leikkauksen jälkeen kylmään veteen, jossa sitä voidaan joutua vielä suoristamaan pensselin avulla, ja siitä objektilasin avulla lämpimään vesihauteeseen, jossa leike oikenee. Vesiliukumikrotomissa ei tarvita erillisiä hauteita eikä näin ollen leikettä jouduta siirtelemään yhtä paljon kuin tavanomaisella rotaatiomikrotomilla työskenneltäessä. Vesiliukuominaisuus ja yhdistetty lämminvesihaude nopeuttavat ja helpottavat leikkeiden käsittelyä.

Leikkeen on oltava tarpeeksi ohut ollakseen riittävän läpinäkyvä, jotta kudoksen rakennetta voidaan tutkia mikroskoopilla (Kiernan 1999, 1). Ohuen leikkeen saamiseksi mikrotomissa käytetyn veitsen on oltava hyvin terävä. Nykyään rutiinistyössä käytetään kertakäyttöisiä teriä, joilla on mahdollista saada leikattua lähes virheettömiä 2–4 µm paksuisia leikkeitä. (Bancroft, Layton & Suvarna 2012, 125–126.) Käytettävien terien lisäksi leikepaksuuteen vaikuttaa blokin lämpötila, veitsen kulma sekä leikkausnopeus. Yleensä

leike leikataan tasaisella ja rauhallisella liikkeellä, mutta sopivan leikkausnopeuden, kuten muunkin mikrotomin käytön, oppii kokemuksen kautta. (Bancroft ym. 2012, 128.)

2.3 Kudosnäytteiden värjääminen

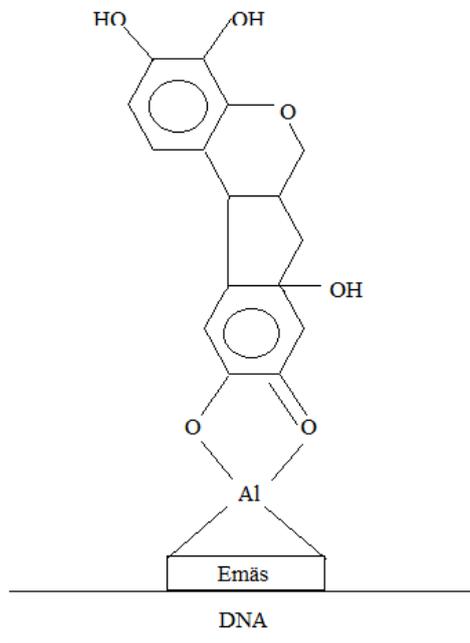
Parafiinilla kyllästetyt kudisleikkeet on värjättävä, ennen kuin kudoksen rakennetta voidaan tutkia mikroskoopilla. Vasta värjäyksen jälkeen leikkeistä voidaan erottaa kudoksen solurakenne ja sen poikkeamat. Eri väriaineilla voidaan korostaa tarkasteltavasta kudoksesta eri rakenteita. Kontrasteja rakenteiden välille saadaan luotua käyttämällä kahta tai useampaa väriainetta. Nykyisin on käytössä kymmeniä eri värjäysmenetelmiä halutun värjäystuloksen saavuttamiseksi. (Orchard & Nation 2012, 34–35.)

Histologiset värjäysmenetelmät perustuvat kemiallisten sidosten syntymiseen väriaineen ja värjättävän kudoksen välillä. Valtaosa väriaineista toimii hapon tai emäksen tavoin muodostaen ionisidoksia kudoksen positiivisesti tai negatiivisesti varautuneiden rakennesien kanssa. (Junqueira & Carneiro 2005, 2.)

Emäksiset väriaineet ovat varaukseltaan positiivisia ja kiinnittyvät kudoksen negatiivisesti varautuneisiin rakennesiin, kuten nukleiinihappojen fosfaattiryhmiin, glykosaminoglykaanien sulfaattiryhmiin ja proteiinien karboksyyliiryhmiin. Näitä ryhmiä esiintyy nukleiinihappojen heterokromatiinissa (fosfaattiryhmät), sytoplasman karkeassa solulimakalvostossa ja ribosomeissa (ribosomaalisen RNA:n fosfaattiryhmät) sekä soluväliaineen molekyyliissä kuten rustokudoksen hiilihydraateissa (sulfaattiryhmät). Emäksisen väriaineen reagointi negatiivisesti varautuneisiin rakenteisiin vaihtelee liuoksen pH:n mukaan. pH:n ollessa korkea (n. 10) fosfaatti-, sulfaatti- ja karboksyyliiryhmät ovat kaikki ionisoituneessa muodossa, jolloin emäksinen väriaine kiinnittyy niihin kaikkiin. Neutraalissa tai hieman happamassa liuoksessa (pH 5–7) sulfaatti- ja fosfaattiryhmät reagoivat emäkseen ja pH:n ollessa matala (alle 4) vain sulfaattiryhmät ovat ionisoituneessa muodossa. Tätä voidaan hyödyntää emäsväreillä värjätessä, jolloin pH:ta säätämällä väri saadaan kiinnittymään haluttuihin komponentteihin. (Ross & Wojciech 2011, 5–6.)

Kaikki emäksisiksi kutsutut väriaineet eivät pelkiltään toimi emäksen tavoin. Esimerkiksi hematoksyliini ei ole itsessään emäksinen väri, eikä näin ollen sellaisenaan kiinnity ne-

gatiivisesti varautuneisiin rakenteisiin, vaan siihen on lisättävä peittäusaineita, joka toimii ”kiinnityskappaleena” kudoksen ja värimolekyylin välillä. Peittäusaineena on useimmiten jokin metalli, kuten alumiini tai rauta. Peittäusaine antaa väriaineelle emäksisen luonteen. Peittäusaineen vaikutuksesta emäksiseksi tehty väriaine poikkeaa ominaisuuksiltaan luontaisesti emäksisestä aineesta, koska se ei kiinnity kudokseen ionisidoksen avulla vaan värimolekyylin ja peittäusaineen välillä on kovalenttinen sidos ja vasta peittäusaine-väriaine-kompleksi muodostaa ionisidoksen kudokseen (kuva 1). Tästä syystä esim. hematoksyliini soveltuu hyvin sellaisiin kahden väriaineen värjäyksiin, jossa toisena värinä käytetään hapanta väriainetta (kuten HE-värjäys). Luontaisesti emäksiset väriaineet hajoavat herkästi kahden väriainekäsittelyn välisissä vesipesuissa. (Ross & Wojciech 2011, 5–6.)



KUVA 1. Hematoksyliinin ja peittäusaineen (Al) muodostaman kompleksin sitoutuminen tuman kromatiiniin (Orchard & Nation 2012, 120)

Happamat väriaineet ovat varaukseltaan negatiivisia ja kiinnittyvät kudoksen positiivisesti varautuneisiin rakenteisiin kuten proteiinien ionisoituneisiin aminoryhmiin. Happaman värin ja kudoksen ja solurakenteiden väliset reaktiot eivät ole kuitenkaan yhtä spesifejä kuin emäksisen värin reaktiot negatiivisesti varautuneisiin rakenteisiin. Happamat väriaineet sitoutuvat sytoplasman säikeisiin, valtaosaan solunsisäisistä kalvorakenteista ja solun ulkoisiin kuituihin, pääosin niiden aminoryhmiin. (Ross & Pawlina 2011, 6.)

3 HEMATOKSYLIINI-EOSIINIVÄRJÄYS

Maailmanlaajuisesti yleisimmin käytetty rutiinivärjäys, jolla kudoksen perusrakenne saadaan edustavasti esiin, on hematoksyliini-eosiinivärjäys eli HE-värjäys. Tässä värjäyksessä käytetään kahta eri väriainetta. Hematoksyliini värjää kudosten happamia osia, kuten tumia ja sytoplasman RNA:ta, eosini puolestaan värjää emäksisiä osia, kuten solunsisäisiä ja -ulkoisia proteiineja. Hematoksyliinillä tuodaan siis rakenteet esiin ja eosiinilla muu tausta. (Mäkinen 2012, 1129.)

Hematoksyliini-eosiinivärjäys keksittiin jo vuonna 1876, mutta sen suosio on säilynyt uusien menetelmien ja väriaineiden kehittyessä (Gill 2010, 119). HE-värjäyksen etuna on selkeä tumavärjäytyvyys. Hematoksyliinillä saadaan tumien sisäiset rakenteet yksityiskohtaisesti korostettua, jolloin tuma-atypiat ovat selkeämmin tunnistettavissa. Eosiinilla taas saadaan sytoplasma ja valtaosa sidekudoksesta värjättyä vaihtelevan sävyiseksi punaiseksi, vaaleanpunaisesta kirkkaanpunaiseen. Glykogeeni ja lima eivät värjäydy ollenkaan HE-värjäyksessä ja niitä tarkasteltaessa on käytettävä jotakin muuta menetelmää, kuten PAS-värjäystä. (Mäkinen 2012, 1129.)

HE-värjäys on säilyttänyt suosionsa käytetyimpänä rutiinivärjäyksenä diagnostisessa histologiassa, vaikka täysin ihanteellinen menetelmä se ei olisikaan. Mitä histologisten värjäysten suorittaja ja värjäyksen tarkastelija ja odottavat käytetyltä väriaineelta? Tätä kysymystä Wittekind (2003) tarkastelee kartoittaessaan optimaalista histologista rutiinivärjäystä ja pohtiessaan HE-värjäyksen puutteita ja korvaavia vaihtoehtoja rutiinivärjäyksiin. Hän listaa ominaisuuksia, joita ihanteellisella rutiinivärjällä tulisi olla:

1. Väriin ainesosien kemiallinen koostumus tulisi olla selvillä.
2. Väriin komponenteilla tulisi olla riittävä liukoisuus ja stabiilisuus.
3. Kudoksen vaurioilla ei pitäisi olla suurta vaikutusta värjäytymiseen.
4. Fiksaatiolla ei pitäisi olla suurta vaikutusta värjäytymiseen.
5. Ei saa olla liian herkkä värjäyksessä käytetylle vedelle.
6. Lyhyt värjäysaika.
7. Värjäyksen mekanismi tulisi olla tunnettu.
8. Hyvä säilyvyysaika.

9. Väripakkausten etikettien tulisi sisältää perustietoa sisällöstä, mm. aineen laatu, kemiallinen kaava ja mahdollinen sertifiointi.
10. Ei saisi sisältää myrkyllisiä ainesosia.
11. Oltava kustannustehokas.

Vaikka HE-väreillä on varsin kattavasti edellä mainitut ominaisuudet, Wittekind (2003) kuitenkin löytää myös puutteita tästä värjäyksestä. Niitä ovat muun muassa riittämätön sytoplasman erottuminen rakenteista, glykoproteiinien, retikuliinisäikeiden, tyvikalvojen ja solun rajojen värjäytymättömyys sekä sytoplasman ja soluväliaineen välisen kontrastin puuttuminen. Hän esittelee tutkimuksessaan muunneltuja versioita perinteisestä HE-värjäyksestä. Näissä hematoksyliini- tai hematoksyliini-eosiinivärjäystä seuraa värjäyksiä tanniinihapolla, azure B:llä ja/tai floksiini B:llä niiden rakenteiden esiintuomiseksi, jotka pelkkä HE-värjäys värjää heikosti tai ei lainkaan. (Wittekind 2003, 261–270.)

3.1 Hematoksyliini

Hematoksyliini värjää nukleinihapot sinisiksi tai sinimustiksi (Orchard & Nation 2012, 18). Hematoksyliinejä voidaan valmistaa lukuisilla eri tavoilla ja erilaisia hematoksyliinejä voidaan soveltaa eri kudoksia värjätessä. Hematoksyliinin, liuottimien ja hapettimien määrä, käytetty peittausaine sekä hapetuksen kesto ja lämpötila vaihtelevat erilaisien hematoksyliinien valmistuksessa. Rutiinivärjäykset suoritetaan laboratorioissa nykyään värjäysautomaateilla ja väriaineet ovat kaupallisesti valmistettuja. (Horobin & Bancroft 1998, 121).

Hematoksyliiniä valmistetaan campechepuusta (*Haematoxylon campechianum*) eli sinipuusta uuttamalla puuainesta kuumassa vedessä ja saostamalla aines liuoksesta urean avulla (Bancroft ym. 2012, 174). Hematoksyliini ei itsessään toimi väriaineena, vaan sen sisältämä hemateiini. Hemateiinia voidaan tuottaa hematoksyliinistä hapettamalla joko luonnollisesti valon ja ilman vaikutuksesta tai kemiallisin menetelmin. (Bancroft ym. 2012, 174)

Hematoksyliiniin lisätään myös peittausainetta, jotta väriaine saadaan sitoutumaan kudoksen nukleinihappoihin. Erilaiset hematoksyliinit luokitellaankin monesti käytetyn

peittausaineen perusteella. Rutiinivärjäyksissä käytetyissä hematoksyliineissä peittausaineena on useimmiten alunan. Vesiliuoksessa hemateiinin ja alunan muodostama yhdiste toimii emäksisen aineen tavoin muodostaen positiivisesti varautuneita ioneja. Kudoksen happamat yhdisteet, kuten DNA ja RNA, ovat negatiivisesti varautuneita, jolloin hematoksyliini-ionit sitoutuvat niihin. (Bancroft ym. 2012, 174.)

Mayerin ja Colen hematoksyliinin valmistusohjeet eroavat toisistaan käytetyn hapettimen ja peittausaineen sekä valmistustavan osalta. Mayerin hematoksyliinissä on käytetty hapettimena natriumjodaattia, Colen hematoksyliinissä jodi-alkoholiliuosta (Bancroft ym. 2012, 174). Mayerin hematoksyliinissä käytetään peittausaineena joko kiinteää kaliumtai ammoniumalunaa ja Colen hematoksyliinissä kaliumalunaliuosta. Colen hematoksyliiniä varten ainekset kiehautetaan ja jäädytetään nopeasti, jonka jälkeen väriaine on käyttövalmista. Mayerin hematoksyliinin valmistus on hitaampaa, sillä hematoksyliinin, alunan ja natriumjodaatin seosta seisotetaan yön yli ennen muiden aineiden lisäystä ja keittämistä. (Bancroft ym. 2012, 175–176.)

3.2 Eosiini

Eosiini Y on yleisin hematoksyliinin vastavärinä histologisissa värjäyksissä käytetty väriaine (Clark 1981, 107). Eosiini löydettiin vuonna 1871. Aluksi sitä käytettiin kudosten värjäämiseen yksin, mutta nykyään sitä käytetään lähinnä yhdessä muiden väriaineiden kanssa. (Woods 1994, 17.) Eosiinia valmistettiin alun perin kovakuoriaisista, mutta nykyisin sen valmistus on täysin synteettistä (Orchard & Nation 2012, 121). Eosiineja valmistetaan kaupallisesti useita eri tyyppejä, joista käytetyin muoto on eosiini Y (Bancroft ym. 2012, 173). Eosiini Y:ssä on hieman kellertävä vivahte, kun taas eosiini B värjää kudoksen pinkimmän sävyiseksi punaiseksi (Clark 1981, 107).

Hematoksyliinin vastavärinä eosiinia käytetään tavallisimmin 1% vesiliuoksena, mutta liuoksen eosiinipitoisuus voi vaihdella 0,5% ja 2% välillä. Alkoholipitoisissa liuoksissa eosiinipitoisuus on yleensä pienempi. (Woods 1994, 17.) Eosiini on hapan väriaine, joka värjää kudoksen emäksisiä osia. Se on vesiliuoksessa varaukseltaan negatiivinen ja näin ollen se kiinnittyy sytoplasman positiivisesti varautuneisiin ioneihin, kuten kudoksen proteiineihin. (Orchard & Nation 2012, 121.) Eosiini värjää proteiininrakenteet, kuten kolla-

geenisäikeet ja sytoplasman tukirangan, punaiseksi tai pinkiksi. Sen etuna on värjäytyvyyden vaihtelu solutyypin, sytoplasman ja sidekudosten välillä. Eosiinilla värjättäessä nämä rakenteet värjäytyvät eri sävyisiksi vaalean- tai tummanpunaisiksi. (Bancroft ym. 2012, 173.)

3.3 Värjäysprosessi hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä

Värjättävistä kudoksenäytteistä on ensiksi poistettava parafiini, jotta väriaine saadaan imeytymään kudokseen (Ross & Wojciech 2011, 2). HE-värjäyksessä parafiini poistetaan pitämällä lasia ksyleenissä. Seuraavaksi ksyleeni poistetaan ja leikkeisiin imeytetään vettä laskevalla alkoholisarjalla, jossa lasia siirretään väkevämmästä etanolista asteittain laimeampaan. Ennen varsinaista värjäystä lasia voidaan huuhdella vedellä. HE-värjäyksessä ensin suoritetaan värjäys hematoksyliinillä, jonka menetelmästä riippuen annetaan vaikuttaa tarpeeksi kauan tai ylivärjätä leike. Jälkimmäisessä tapauksessa ylimääräinen väri poistetaan happopesulla. Värjäyksen jälkeen lasi huuhdellaan juoksevalla vedellä. Seuraavaksi lasit värjätään eosiinilla, jonka jälkeen lasit jälleen huuhdellaan juoksevalla vedellä ja vesi poistetaan nousevalla alkoholisarjalla, jossa lasia siirretään laimeammasta etanolista väkevämpään. Lopuksi lasit päällystetään kiinnitysaineella ja niiden päälle asetetaan peitinlasi. (Kiernan 1999, 111–112.)

Hematoksyliineillä, joissa on käytetty peittäusaineena alunaa, voidaan värjätä leike kahdella eri tavalla: etenevästi (progressiivinen värjäys) tai palautuvasti (regressiivinen värjäys). Palautuvassa värjäyksessä hematoksyliinin annetaan ”ylivärjätä” leike. Hematoksyliiniä tarttuu tällöin muihinkin kudoserakenteisiin kuin nukleiinihappoihin ja ylimääräinen väri poistetaan taustasta pesemällä lasi nopeasti laimealla suolahappoliuoksella. Pesun jälkeen väriaineen pitäisi olla mikroskoopilla nähtävissä vain tumissa eikä juurikaan taustassa. (Bancroft ym. 2012, 174–175.)

Etenevässä värjäyksessä hematoksyliinin annetaan vaikuttaa vain määrätyn ajan, jolloin väriainetta ehtii tarttua riittävästi nukleiinihappoihin, mutta ei merkittävästi muihin rakenteisiin. Etenevässä värjäyksessä hematoksyliinin vaikutusaika määrittää värjäytyvyyden intensiteetin ja palautuvassa värjäyksessä puolestaan suolahappopesun kesto. Molemmissa menetelmissä käytettyyn aikaan vaikuttaa hematoksyliiniväri ikä, värjättävä kudostyyppi sekä kudostyyppiä arvioivan patologin visuaaliset mieltymykset.

(Bancroft ym. 2012, 175.) Hematoksyliini värjää tumat aluksi punaiseksi ja väri muuntuu siniseksi, kun leikettä huuhdellaan heti väriaineen jälkeen laimealla emäksellä. Vesijoh-
tovesi riittää yleensä tuottamaan värimuutoksen. Tätä menettelyä kutsutaan leikkeen ”si-
nistykseksi”. (Bancroft ym. 2012, 174–175.)

3.4 Värjäytymiseen vaikuttavat tekijät hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä

Näytteiden värjäysprosessin onnistumiseen vaikuttaa oleellisesti preparaatin fiksaatio ja
alkukäsittely. Käytetyn fiksatiivin ainesosat vaikuttavat eri tavoin eri kudusrakenteiden
säilyvyyteen sekä väriaineiden sitoutumiseen. Esimerkiksi rasvat säilyvät formaliinifik-
soidussa kudoksessa huonosti. Parafiinilla kyllästämisen jälkeen kudospaloista leikattu-
jen leikkeiden paksuus vaikuttaa värin intensiteettiin. Mitä paksumpi leike, sitä voimak-
kaampi väri. Hyvin tummaksi värjäytyneestä leikkeestä voi olla vaikea erottaa eri kudos-
rakenteita. Ohuet leikkeet värjäytyvät lyhyemmässä ajassa kuin paksut leikkeet. (Horobin
2012, 163–164.)

Tasainen värjäytyminen edellyttää myös tasalaatuista, rypytöntä kudisleikettä. Kudoksen
tyypilliset rakenneominaisuudet, kuten huokoisuus tai rakkulaisuus, tai kudoksen turpoa-
minen käsittelyn aikana vaikuttavat värjäytyvyyteen. Turvonneeseen kudokseen väri
imeytyy usein nopeammin kuin normaaliin kudokseen. Esimerkiksi kollageenisäikeet tur-
poavat happamassa ympäristössä ja limat ja rustokudos vesiliuoksissa. (Bancroft ym.
2012, 163–164.)

Leikkeen tasaisuus on oleellista kudoksen värjäytyvyyden kannalta. Epätasaisesti leik-
kautunut leike ei ole tasalaatuinen vaan siinä on paksumpia ja ohuempia kohtia. Värjäyk-
sessä paksut ja ohuet kaistaleet voivat värjäytyä toisistaan poikkeavalla intensiteetillä ja
värisävyltä ja tämä näkyy mikroskoopissa kudoksen ”raidallisuutena”. (Bancroft ym.
2012, 164.) Leikkeen epätasaisuutta voidaan estää huolehtimalla, että mikrotomin veitsi
sekä leikattava kudusblokki pysyvät hyvin paikallaan, veitsi on tarpeeksi terävä ja aseteltu
oikeaan kulmaan blokkiin nähden. Blokin ja veitsen asettelusta löytyvät suositukset käy-
tettävän mikrotomin ohjekirjasta. Myös parafiinin tai itse kudoksen kovuus voi aiheuttaa
epätasaisen leikkaantumisen. Kovaa kudosta voi pehmentää hautamalla sitä hetken läm-

pimällä vedellä kostutetulla vanulla. Parafiini voi jähmettyä liian kovaksi, jos blokkia pitää kauan kylmälevyllä ennen leikkaamista. Blokin voi antaa lämmitä hieman huoneenlämmössä tai sitä voi lämmittää pitämällä sitä hetken kädessä. (Ellis 2002.)

Näytteen laatuun liittyvien tekijöiden lisäksi värjäytymiseen vaikuttaa myös käytettyjen väriaineiden laatu. Kaupallisesti valmistetuissa eosineissa ja hematoksyliineissa on yleensä korkea väriainepitoisuus ja vähän kontaminaatioita. Hematoksyliini tosin muuttuu ikääntyessään. Luonnollisesti hapetetut hematoksyliinit voivat säilyttää värjäysominaisuutensa vuosia, kun kemiallisesti hapetettujen hematoksyliinien säilyvyys on noin puoli vuotta. Sakan muodostuminen kemiallisesti hapetettuun hematoksyliiniin on merkki aineen vanhentumisesta. Sakkautunut hematoksyliini voidaan suodattaa ja sillä värjättävien näytteiden värjäysaika pidentää. (Horobin & Bancroft 1998, 90–91.)

Värjäykseen käytetty aika vaikuttaa lopputulokseen useimpien histologisten värien kohdalla. Värjäysajat ovat viitteellisiä ja ne riippuvat useista tekijöistä. Pelkästään erilaisten hematoksyliinien välillä värjäysajoissa voi olla kymmenien minuuttien ero. Hematoksyliinillä värjätessä värjäysaikaan vaikuttavat käytetty hematoksyliini, värin ikä ja se, kuinka paljon sitä on käytetty, näytteiden esikäsittely, käytetty värjäysmenetelmä ja vastaväri sekä visuaaliset mieltymykset. (Bancroft ym. 2012, 177–178.)

4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten Colen hematoksyliini värjää kudoksenäytteet HE-värjäyksessä verrattuna Mayerin hematoksyliiniin. Opinnäytetyön tavoitteena oli tehdä värjäytymistulosten arviointi Colen hematoksyliinille, jotta työn toimeksiantaja Reagentia Oy voisi virallisesti hyväksyä Colen hematoksyliinin niin sanotuksi IVD-tuotteeksi ja vapauttaa väriaineen yleiseen myyntiin. Värjäytymistulosten arvioinnin lisäksi Colen hematoksyliinistä oli ennen IVD-tuotteeksi hyväksymistä tehtävä säilyvyysseuranta, jonka teki Colen hematoksyliiniä rutiinivärjäyksissä käyttävä laboratorio.

Opinnäytetyössä oli kaksi tutkimuskysymystä:

1. Miten solut värjäytyvät HE-värjäyksessä Mayerin hematoksyliinillä värjättäessä?
2. Miten solut värjäytyvät HE-värjäyksessä Colen hematoksyliinillä värjättäessä?

5 KOKEELLINEN KVANTITATIIVINEN TUTKIMUS

Tieteellisessä tutkimuksessa pyritään selvittämään tutkittavan kohteen toimintaperiaatteita ja lainalaisuuksia. Tutkimus voi olla teoreettista tutkimusta, jossa hyödynnetään valmiista tietomateriaalia, tai empiiristä eli havainnoivaa tutkimusta. Empiirinen tutkimus perustuu menetelmiin, jotka on kehitetty teoreettisen tutkimuksen perusteella. Empiirissä tutkimuksessa voidaan esimerkiksi tutkia, toteutuuko jokin teoriasta johdettu oletamus käytännössä. Empiirinen tutkimus voidaan edelleen jaotella kvalitatiiviseen eli laadulliseen ja kvantitatiiviseen eli määrälliseen tutkimukseen. (Heikkilä 2010, 13.)

Tutkimusotteen valinta riippuu tutkittavasta ilmiöstä. Kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus edellyttää, että ilmiö ja siihen vaikuttavat tekijät tunnetaan. Määrällisessä tutkimuksessa nämä tekijät muutetaan muuttujiksi, joita voidaan mitata ja käsitellä tilastollisin menetelmin, esimerkiksi laskea muuttujien välisiä riippuvuussuhteita. (Kananen 2011, 12–15.) Kvantitatiivinen tutkimus perustuu mittaamiseen, jonka tarkoituksena on tuottaa luotettavaa, perusteltua ja yleistettävissä olevaa tietoa (Kananen 2011, 18).

Opinnäytetyömme on kokeellinen kvantitatiivinen tutkimus. Kokeellisen tutkimuksen avulla tutkitaan jonkin muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan kontrolloiduissa olosuhteissa. Ominaista kokeelliselle tutkimukselle on, että siinä pyritään vakioimaan kaikki muut tekijät tutkittavaa muuttujaa lukuun ottamatta. (Heikkilä 2010, 21.) Tyypillisesti kokeellisessa tutkimuksessa tehdään koejärjestely, jossa olosuhteita voidaan muunnella systemaattisesti (Hirsjärvi ym. 2009, 134). Tässä työssä teimme laboratorio-olosuhteissa kokeen, jossa tarkastelimme käytetyn hematoksyliinin vaikutusta värjäystulokseen, eli hematoksyliini oli kokeen muuttuva tekijä. Muita muuttujia kontrolloimme käsittelemällä kaikkia värjättäviä näytteitä samalla tavoin, samoissa olosuhteissa ja samoin reagenssein hematoksyliiniä lukuun ottamatta.

6 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

6.1 Näyte

Työn kokeellista osuutta varten tarvitsimme kudoksenäytteitä, joista valmistaa leikkeitä värjättäviksi. Jotta erot kahden eri väriaineen värjäystuloksissa tulisivat mahdollisimman kattavasti ilmi, oli näytteiden edustettava eri kudostyyppisiä ja sisällettävä erilaisia rakenteita. Saimme opinnäytetyötä varten näytteeksi monikudosblokin erään suomalaisen keskussairaalan patologian laboratorion. Blokissa oli näytepalat seitsemästä eri kudoksesta: tonsillasta eli nielurisasta, appendixista eli umpilisäkkeestä, munuaisesta, ihosta, maksasta, haimasta ja istukasta. Meille suositeltiin kyseisestä patologian laboratorion laajaa kudospaneelia tätä tutkimusta varten. Edellä mainitut kudokset valikoituivat paneeliin siksi, että niitä värjätään usein laboratorion rutiinivärjäyksissä. Kaikki näytepalat olivat benigniä kudosta. Monikudosblokin käyttö helpotti näytteen mikroskopointia, sillä samalle objektilasille saatiin kaikki tarkasteltavat kudokset. Blokin yhteydessä saimme myös kartan, josta selvisi eri kudosten sijainti blokissa.

Leikkasimme näytteestä kolmen mikrometrin paksuisia leikkeitä Thermo Scientific Microm HM 340E -vesiliukumikrotomilla. Käytimme näytteen leikkaamiseen kertakäyttöisiä Feather S35 -teriä. Leikkaamisen yhteydessä numeroimme lasit juoksevin numeroin.

6.2 Näytteiden värjääminen

Objektilaseille kiinnitetyt kudospelkkeet värjäsimme manuaalisesti käyttäen Reagen Oy:n toimittamia väriaineita. Reagen Oy:ssä on valmistettu Colen hematoksyliiniä asiakkaan reseptillä tilauksesta. Käytimme värjäysten tekoon asiakkaan käyttämää HE-värjäyksen ohjetta, jota käytetään asiakaslaboratoriossa Colen hematoksyliinillä värjätessä värjäysautomaatilla. Käytimme molempien värjäysten tekoon samaa ohjetta ja hematoksyliiniä lukuun ottamatta samoja reagensseja, jotta ainoa värjäysten välillä poikkeava tekijä olisi värjäyksessä käytetty hematoksyliini. Teimme värjäykset manuaalisesti rinnakkain siten, että siirsimme näytteet liuoksesta seuraavaan samanaikaisesti. Värjäyksen jälkeen kiinnitimme objektilaseille peitinlasit. Tarkistimme leikkeiden ja värjäytymisen laadun mikroskopoimalla näytelasit ennen niiden toimittamista varsinaiseen arvioon.

6.3 Arviointilomakkeen laatiminen

Värjäystulosten arviointia varten teimme laadulliseen asteikkoon perustuvan arviointilomakkeen (ks. Liittet 1 ja 2), jonka avulla solubiologit voisivat arvioida värjäyksiä numeerisesti. Lomakkeen laatimisen lähtökohtana käytimme tutkimuskysymyksiämme ja toimeksiantajamme toivomuksia. Tarkoituksena oli saada mahdollisimman hyvä kuva siitä, miten värjäystulokset poikkeavat toisistaan ja miten Colen hematoksyliini soveltuu kudoksenäytteiden värjäämiseen.

Käytimme lomakkeessa strukturoituja kysymyksiä, eli kysymyksissä oli valmiit vastausvaihtoehdot, joista vastaaja valitsi lähimpänä omaa näkemystään olevan vastauksen. Strukturoituihin kysymyksiin vastaaminen on nopeaa ja strukturoiduilla kysymyksillä saatujen vastausten tilastollinen käsittely helppoa. Toisaalta strukturoiduissa kysymyksissä jokin vastausvaihtoehto saattaa puuttua ja vaihtoehdot ja niiden esittämisjärjestys voivat olla johdattelevia. (Heikkilä 2010, 51.)

Kysymyksiin vastattiin viisiportaisella asteikolla, jossa numero 1 tarkoitti arviota "huono", numero 2 arviota "välttävä", numero 3 arviota "tydyttävä", numero 4 arviota "hyvä" ja numero 5 arviota "erinomainen". Asteikkojen numerointi kannattaakin tehdä siten, että positiivisimmalla arviolla on suurin numeroarvo (Kananen 2011, 35). Mieli-
pi-
teiden tai asenteiden mittaamisessa käytetään usein viisi-, seitsemän- tai yhdeksänportaista asteikkoa eli Likertin asteikkoa. Vastausvaihtoehtojen pariton määrä antaa vastaajalle mahdollisuuden olla ottamatta kantaa asiaan valitsemalla mitta-asteikon keskimmäisen portaan. (Valli 2010, 118.)

Lisäsimme lomakkeeseen myös yhden avoimen kysymyksen, jotta sellaisetkin seikat värjäystuloksissa tulisivat ilmi, jotka rajautuvat strukturoitujen kysymysten ulkopuolelle. Avoimet kysymykset eivät rajaa mitään vastausvaihtoehtoa pois, joten ne voivat tuottaa tietoa, jota strukturoiduilla kysymyksillä ei tavoiteta (Kananen 2011, 30–31). Avointen kysymysten käyttö onkin tarkoituksenmukaista, jos vastausvaihtoehtoja ei valmiiksi tunneta tarkkaan. Avointen kysymysten vastauksista voi myös saada tutkittavaan asiaan uusia näkökantoja. (Heikkilä 2010, 49–50.)

Arviointilomakkeen laadinnassa pyrimme kiinnittämään huomiota erityisesti kysymysten laatuun. Pyrimme tekemään kysymyksistä mahdollisimman selkeitä ja vältimme käyttämästä sanoja, jotka eri vastaajat voisivat ymmärtää eri tavoin. Hyvillä kysymyksillä onkin tiettyjä ominaispiirteitä. Kysymysten tulisi olla muun muassa ymmärrettäviä, yksiselitteisiä ja hyödyllisiä. Kysymykset eivät saa olla johdattelevia, liian pitkiä tai monimutkaisia, eikä montaa asiaa saa kysyä samassa kysymyksessä. (Heikkilä 2010, 57.) On tärkeää, että kaikki vastaajat ymmärtävät kysymyksen samalla tavalla. Vastaajilla on myös oltava kysymysten edellyttämä tieto sekä halu antaa kysymyksiä koskevaa tietoa. (Kananen 2011, 30.)

Teimme lomakkeesta kaksiosaisen, sillä halusimme kerätä samat tiedot sekä Colen että Mayerin hematoksyliinillä värjäytyistä näytteistä. Selkeyden vuoksi tulostimme kaksi erillistä paperilomaketta, joista toiseen vastattiin Colen ja toiseen Mayerin hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden värjäytymistulosten arviointi. Päätimme toteuttaa arvioinnin paperille tulostettuina lomakkeina, sillä oletimme, että vastaajat haluavat mahdollisesti tehdä arvioinnin mikroskopoinnin yhteydessä, jolloin sähköisen lomakkeen täyttäminen voisi olla hankalaa.

Halusimme tehdä lomakkeesta vastaajan kannalta mahdollisimman selkeän ja helppokäyttöisen, jotta vastaaminen kävisi nopeasti ja vaivattomasti ja siten kenties vastaamisen kynnyskin madaltuisi. Koska vastaaja joutuisi arvioimaan usean eri kudoksen värjäytymistuloksia kahdella eri väriaineella, päätimme tiivistää kysymykset taulukkomuotoon. Värjättyjä kudoksia oli seitsemän ja värjäytymistuloksia koskevia strukturoituja kysymyksiä neljä, joten taulukkoon sisältyy yhteensä 28 kysymystä. Taulukon vaakariveillä olivat kysymykset ja pystysarakkeissa eri kudokset. Taulukon alla pyysimme vielä avointa sanallista arviota värjäystuloksista.

6.4 Aineiston käsittely

Tässä opinnäytetyössä mahdollisten arvioijien ryhmä oli varsin pieni, sillä se rajautui kliinisissä laboratorioissa työskenteleviin solubiologeihin. Kudosnäytteiden värjäytymistulosten arviointi vaatii korkeaa asiantuntemusta sekä kokemusta histologisten näytteiden tarkastelusta, joten kysely oli suunnattava alan ammattilaisille. Koska kohderyhmä oli

rajallinen, myös saamamme aineisto oli pieni. Saimme vastaukset kahden eri organisaation solubiologeilta.

Taulukoimme saamamme vastaukset samankaltaiseen taulukkoon, jota arviointilomakkeessakin käytettiin. Mayerin hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden arviointi esitetään Tulokset-kappaleessa omassa taulukossaan ja Colen hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden arviointi omassaan. Kunkin kysymyksen vastauksista laskimme keskiarvon (\bar{x}). Lisäksi toimme jokaisen kysymyksen osalta esiin pienimmän (min) ja suurimman (max) arvon, jolla kysymykseen oli vastattu. Näin tuloksia tarkastellessa on helppo nähdä, kuinka paljon hajontaa eri vastaajien vastauksissa on. Molempien taulukoiden alapuolella olemme nostaneet esiin huomionarvoisia seikkoja värjäytymistulosten saamista arvioista. Tulokset-kappaleessa käsittelemme myös avoimiin kysymyksiin saamiamme vastauksia ja havainnollistamme värjäytymisen eroja mikroskooppikuvin.

7 TULOKSET

7.1 Solujen värjäytyminen Mayerin hematoksyliinillä HE-värjäyksessä

Taulukossa 1 on esitetty Mayerin hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden saamien numeristen arvioiden keskiarvo, minimiarvo ja maksimiarvo. Arviot on merkitty kunkin kudoksen kohdalle asteikolla 1-5.

1=Huono 2=Välttävä 3=Tyydyttävä 4=Hyvä 5=Erinomainen

TAULUKKO 1. Mayerin hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden arviointi

MAYERIN HEMATOKSYLIINI	Tonsilla			Appendix			Munuainen			Iho			Maksa			Haima			Istukka			Kaikki kudokset
	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}
Kudoksen rakenteen erottuminen	3,5	3	4	3,5	3	4	3	2	4	2	1	3	3	2	4	4,5	4	5	4	4	4	3,4
Tuman rakenteiden erottuminen	4	3	5	4,5	4	5	4,5	4	5	4	4	4	4,5	4	5	4,5	4	5	5	5	5	4,4
Tumien ja kudoksen välinen kontrasti	3	2	4	3	2	4	2	1	3	2	1	3	2,5	3	2	4	3	5	3,5	3	4	2,9
Värjäyksen soveltuvuus kudoksen tarkasteluun	3,5	3	4	3,5	3	4	3,5	3	4	3	2	4	3,5	4	3	4,5	4	5	4	4	4	3,6
Kaikki ominaisuudet	3,5			3,6			3,3			2,8			3,4			4,4			4,1			3,6

Arviot kudoksen rakenteen erottumisesta Mayerin hematoksyliinillä värjäytyissä näytteissä vaihtelevat kudoksen ja arvioijan mukaan. Heikoimman arvion on saanut iho, jonka rakenteen erottumisen toinen vastaajista on arvioinut huonoksi. Arvioiden keskiarvokin jää ihon kohdalla välttäväksi. Parhaiten vastaajien mielestä on erottunut haiman rakenne.

Mayerin hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden arvioinneissa merkille pantavaa on erityisesti tuman rakenteiden hyväksi arvioitu erottuminen. Lähes kaikkien kudosten kohdalla molemmat arvioijat ovat antaneet tuman rakenteiden erottumiselle arvion hyvä (4) tai erinomainen (5). Ainoastaan tonsillan kohdalla toinen arvioija on antanut arvion tyydyttävä.

Sen sijaan tumien ja muun kudoksen välinen kontrasti on selkeästi arvioitu heikoimmaksi osa-alueeksi Mayerin hematoksyliinillä värjäytyissä näytteissä. Munuainen ja iho saivat kontrastin keskiarvoksi välttävän. Näiden kudosten kohdalla toinen vastaaja oli arvioinut

kontrastin huonoksi ja toinen tyydyttäväksi. Muissa kudoksissa kontrasti arvioitiin hie-
man paremmaksi, ja haima sai arvioiden keskiarvoksi hyvän. Arviot vaihtelevat melko
paljon arvioijien välillä, sillä esimerkiksi tonsillan ja appendixin kohdalla toinen vastaaja
on antanut arvion välttävä ja toinen arvion hyvä.

Värjäyksen soveltuvuus kudoksen tarkasteluun on kudoksesta ja vastaajasta riippuen saa-
nut arvioita välttävästä erinomaiseen. Tonsilla, appendix, munuainen ja maksa saivat so-
veltuvuuden keskiarvoksi 3,5, mikä sijoittuu tyydyttävän ja hyvän väliin. Ihon kohdalla
arvioiden keskiarvo jää tyydyttäväksi. Haiman ja istukan tarkasteluun värjäys soveltuu
vastaajien mukaan parhaiten.

7.2 Solujen värjäytyminen Colen hematoksyliinillä HE-värjäyksessä

Taulukossa 2 on esitetty Colen hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden saamien numee-
risten arvioiden keskiarvo, minimiarvo ja maksimiarvo. Arviot on merkitty kunkin ku-
doksen kohdalle asteikolla 1-5.

1=Huono 2=Välttävä 3=Tyydyttävä 4=Hyvä 5=Erinomainen

TAULUKKO 2. Colen hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden arviointi

COLEN HEMATOKSYLIINI	Tonsilla			Appendix			Munuainen			Iho			Maksa			Haima			Istukka			Kaikki kudokset			
	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max		\bar{x}		
Kudoksen rakenteen erottuminen	4	4	4	4,5	4	5	4,5	4	5	4,5	4	5	4,5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,3
Tuman rakenteiden erottuminen	4,5	4	5	4,5	4	5	4	4	4	5	5	5	4,5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,4
Tumien ja kudoksen välinen kontrasti	3,5	3	4	4	3	5	3,5	3	4	4	3	5	4	3	5	3,5	3	4	4,5	4	5	4,5	4	5	3,9
Värjäyksen soveltuvuus kudoksen tarkasteluun	4,5	4	5	4,5	4	5	4	4	4	4,5	4	5	4,5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4,3
Kaikki ominaisuudet	4,1			4,4			4			4,5			4,4			3,9			4,1			4,1			4,2

Colen hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden arvioinnissa kaikkien kudosten rakenteen erottuminen on arvioitu joko hyväksi tai erinomaiseksi. Parhaimmat arviot rakenteen erottumisesta ovat saaneet appendix, munuainen, iho ja maksa.

Samoin tuman rakenteiden erottuminen on molemmilta vastaajilta kaikkien kudosten osalta saanut arvion hyvä tai erinomainen. Ihonäyte on molemmilta arvioijilta saanut tältä osin arvion erinomainen.

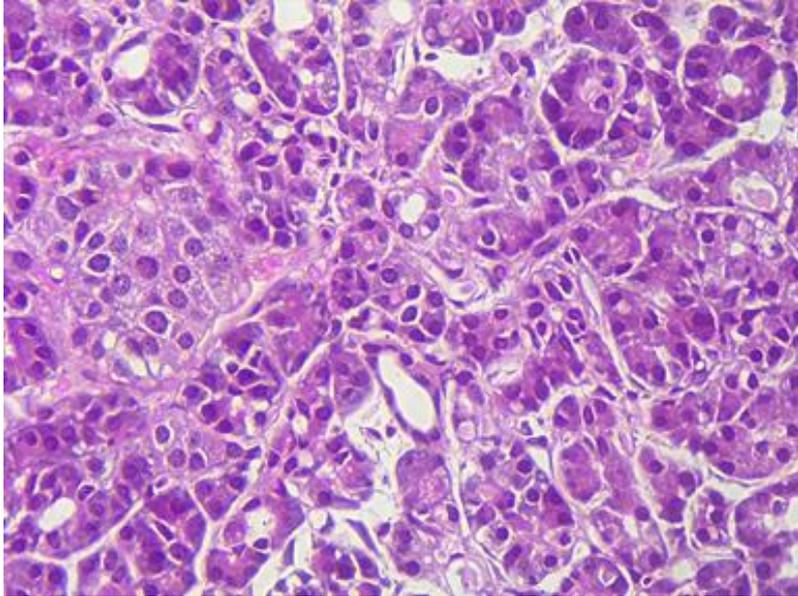
Tumien ja muun kudoksen välinen kontrasti on keskimäärin arvioitu hieman heikommaksi kuin muut värjäytymisen osa-alueet. Tältä osin vastaajien arviot poikkeavat muita kysymyksiä enemmän toisistaan, sillä toinen vastaajista on arvioinut useimpien kudosten kohdalla kontrastin olevan tyydyttävä. Vastausten keskiarvot vaihtelevat arvojen 3,5-4,5 välillä.

Värjäyksen soveltuvuuden kudoksen tarkasteluun ovat molemmat vastaajat kaikkien kudosten osalta arvioineet joko hyväksi tai erinomaiseksi. Parhaimman arvion soveltuvuudesta ovat saaneet tonsilla, appendix, iho ja maksa.

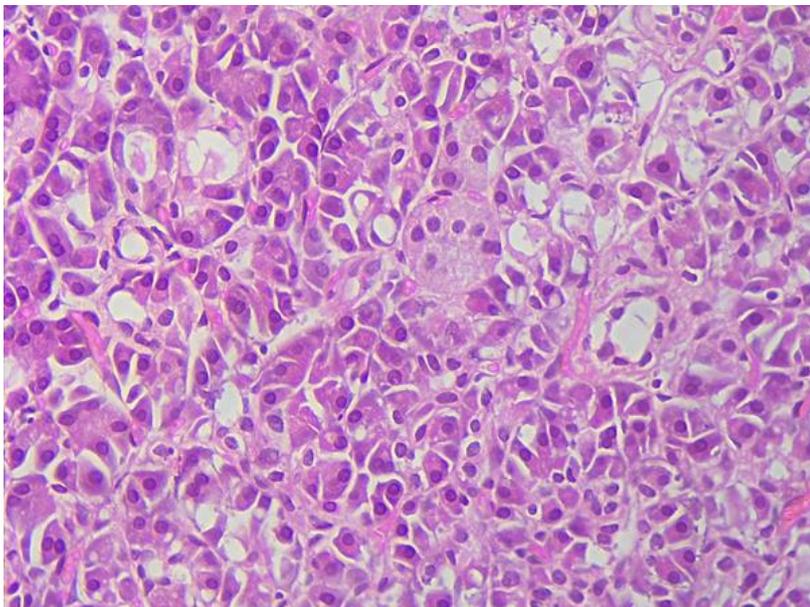
7.3 Esimerkkikuvia värjäyksistä

Alla esittelemme muutamia mikroskooppikuvia värjäytyistä kudoksista. Kuvat on otettu 40x suurennoksella mikroskopoiduista näytteistä. Valitsimme nämä kudokset kuvattaviksi saamiemme arvioiden perusteella. Niissä havainnollistuvat erityisen hyvin arvioinnin kriteereinä olleet ominaisuudet ja niiden erot käytettyjen hematoksyliinien välillä.

Haiman värjäytyminen oli molempien arvioijien mielestä parempi Mayerilla kuin Colella värjättäessä. Toisen arvioijan mukaan haima on Colella värjäytynyt hieman yli, jolloin tulkinta vaikeutuu. Mayerin hematoksyliinillä värjäystulos on selkeämpi. (Kuvat 2–3.)

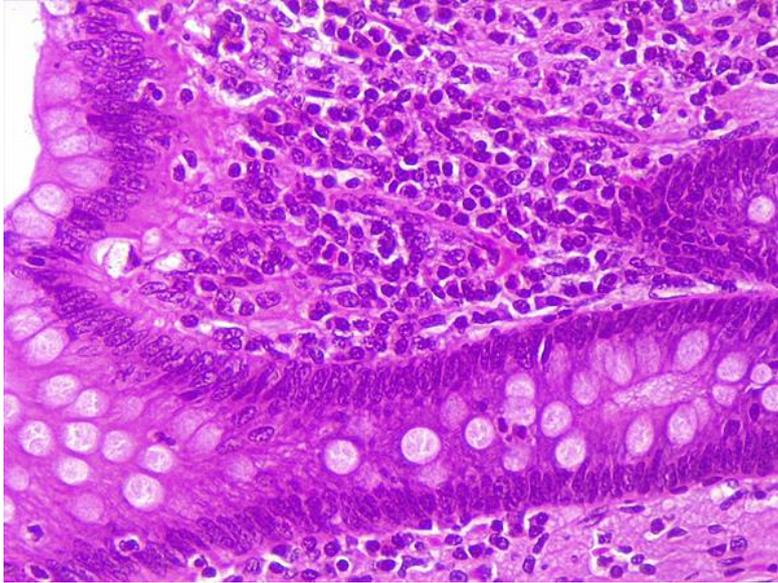


KUVA 2. Haima Colen hematoksyliinillä värjätynä

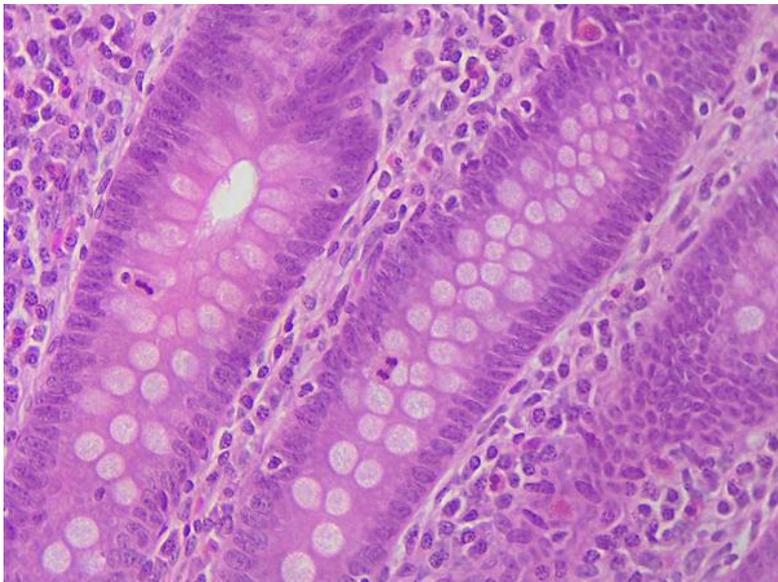


KUVA 3. Haima Mayerin hematoksyliinillä värjätynä

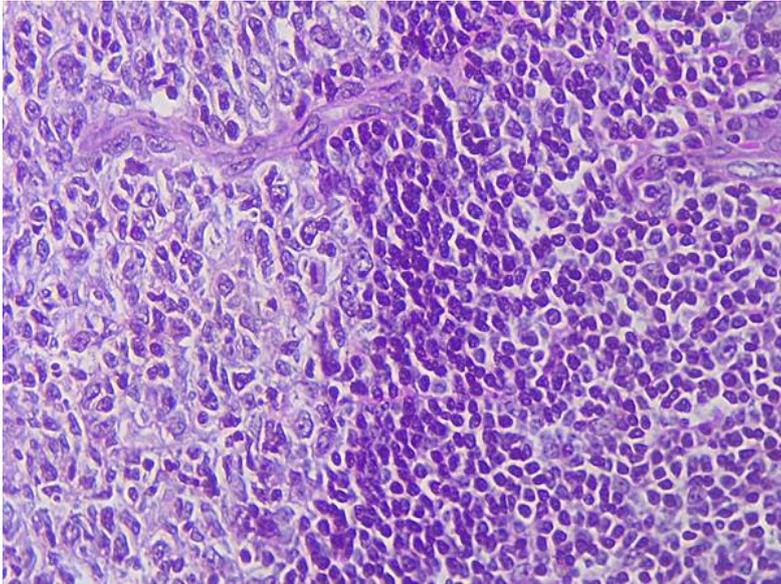
Umpilisäkkeen (appendix) rakenne erottui arvioissa hieman paremmin Colella värjätessä kuin Mayerilla. Tumien ja muun kudoksen välinen kontrasti on parempi. (Kuvat 4–7.)



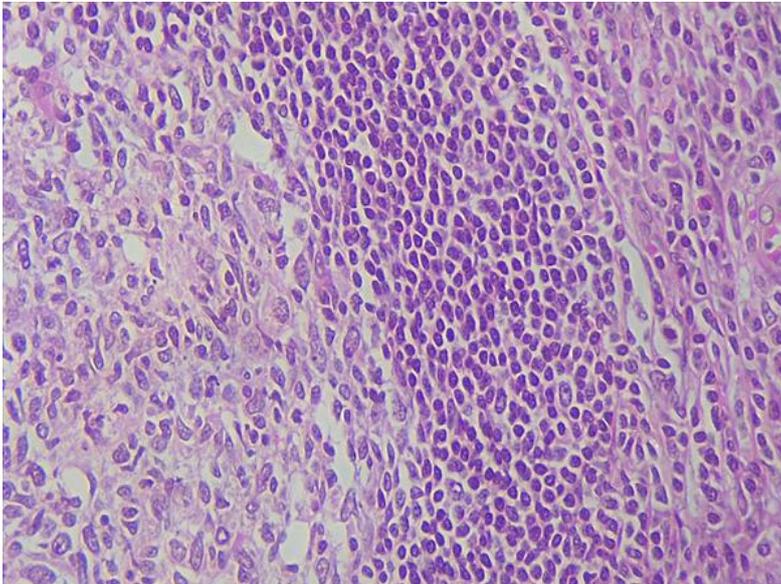
KUVA 4. Appendix 1 Colen hematoksyliinillä värjätynä



KUVA 5. Appendix 1 Mayerin hematoksyliinillä värjätynä

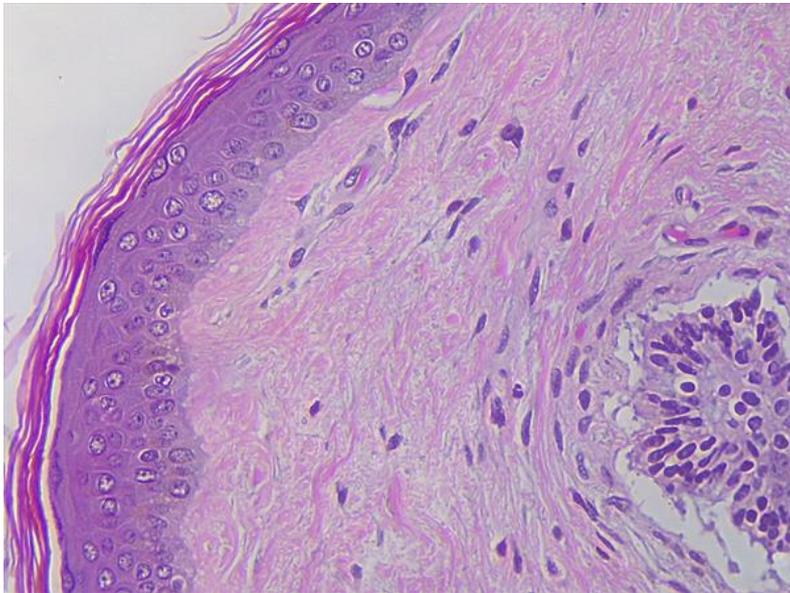


KUVA 6. Appendix 2 Colen hematoksyliinillä värjätynä

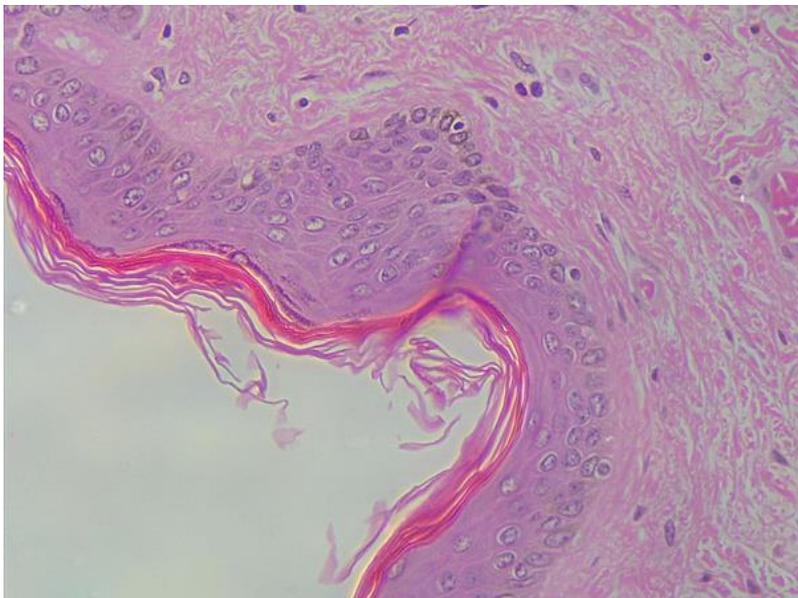


KUVA 7. Appendix 2 Mayerin hematoksyliinillä värjätynä

Ihonäytteessä ero Colen ja Mayerin välillä oli suurin. Mayerilla värjättäessä iho jäi liian haaleaksi ja sai vertailun alhaisimman keskiarvon. Colella värjättäessä kudoksen ominaisuudet tulivat taas parhaiten esiin kaikista värjätyistä näytteistä. Erityisesti tumien rakenteet erottuvat erinomaisesti. (Kuvat 8–9.)



KUVA 8. Iho Colen hematoksyliinillä värjätynä



KUVA 9. Iho Mayerin hematoksyliinillä värjätynä

7.4 Tulosten yhteenveto

Molemmat vastaajat toivat esiin, että värjäyksissä käytettyä värjäysohjetta ei todennäköisesti oltu optimoitu Mayerin hematoksyliinille, minkä vuoksi värjäytyminen Mayerin hematoksyliinillä ei ollut optimaalista. Mayerin hematoksyliinillä värjättyjen näytteiden värjäytymistä kuvailtiin "vaisuksi" ja hematoksyliinin kerrottiin olevan liian heikko, minkä vuoksi kontrasti on puutteellinen. Colen hematoksyliinillä värjäytyissä näytteissä eosiniin kerrottiin olevan paremmin tasapainossa ja kontrastin ja intensiteetin olevan parempi kuin Mayerin hematoksyliinillä värjäytyissä näytteissä. Toisaalta toisen vastaajan mielestä Colen hematoksyliinillä värjäytyissä näytteissä tumamorfologia oli heikommin nähtävissä. Toinen vastaajista toi myös esiin, että molemmissa värjäyksissä eosini olisi voinut olla "aivan hieman voimakkaampi", jolloin myös kontrasti olisi parempi ja eosiniin eri sävyt erottuisivat selkeämmin.

Toinen vastaajista kehotti huomioimaan, että leikepaksuus vaikuttaa värjäytymiseen huomattavasti. Vaikka leikkasimme kaikki leikkeet kolmen mikrometrin paksuisina, todellisuudessa leikepaksuus kuitenkin vaihtelee eri lasien välillä. Mikrotomin viilennysominaisuudesta huolimatta näyteblokki aina hieman lämpenee sen jälkeen, kun se otetaan kylmälevyltä leikattavaksi, ja muun muassa blokin lämpötila ja leikkausnopeus vaikuttavat leikepaksuuteen.

8 POHDINTA

8.1 Tutkimuksen luotettavuus

Koska kudoksenäytteiden värjäytymistulosten arviointi riippuu osittain henkilökohtaisista visuaalisista mieltymyksistä, olisi tutkimuksen luotettavuutta lisännyt värjäysten arvioijien suurempi lukumäärä. Jos arvioita olisi ollut enemmän, olisi niiden tilastollinen käsittely voinut olla monipuolisempaa. Myös patologin arvio olisi ollut hyvä saada mukaan, sillä patologien ja sairaalaselubiologien koulutus ja työtehtävät poikkeavat toisistaan.

Värjäykseen käyttämämme värjäysohje oli saatu laboratorion, jossa HE-värjäyksessä käytetään Colen hematoksyliiniä, joten todennäköisesti ohje on optimoitu juuri Colen hematoksyliinille. Tämän toi esille myös toinen värjäysten arvioijista. Halusimme kuitenkin käyttää sekä Mayerin että Colen hematoksyliinille samaa värjäysohjetta, jotta juuri hematoksyliinin vaikutus näytteiden värjäytymiseen tulisi ilmi. Tämä teki tutkimusasetelmasta selkeämmän ja helpommin toteutettavan. Yksi vaihtoehto tutkimuksen toteuttamiseen olisi ollut värjätä näytteet kahden eri värjäysprotokollan mukaisesti, jolloin molemmille hematoksyliineille olisi voitu valita juuri kyseiselle hematoksyliinille optimoitu protokolla. Tällaisessa toteutuksessa olisi kuitenkin ollut ongelmallista arvioida, mikä tekijä olisi värjäytymisen erot aiheuttanut. Hematoksyliinin lisäksi eroja voisivat aiheuttaa esimerkiksi käytetyt värjäysajat tai muut eroavaisuudet värjäysprotokollassa.

8.2 Tutkimuksen eettisyys

Opinnäytetyön teoreettista osuutta kirjoittaessamme olemme käyttäneet lähdemateriaalina ensisijaisia lähteitä ja ilmoittaneet käytetyt lähteet sekä tekstiviitteissä että lähdeluettelossa. Olemme käyttäneet lähteitä siten, ettei tekstin alkuperäinen tarkoitus muutu. Opinnäytetyön teoriaosuudessa olemme käyttäneet lähdeaineistona enimmäkseen kansainvälisesti tunnettujen histologian asiantuntijoiden julkaisemaa materiaalia.

Tutkimuksessa näytteenä olleessa monikudosblokissa oli kudospaloja useilta eri henkilöiltä. Saimme näytteen vailla mitään henkilötietoja, joten kudokset jäävät anonyymeiksi

sekä meille että opinnäytetyön lukijoille. Kudosnäytteiden käyttäminen opetus- ja tutkimustarkoituksiin sen jälkeen, kun patologi on antanut niistä diagnoosin, on alalla ja sen opiskelussa yleinen käytäntö. Ilman ihmisperäisiä ja välittömästi irrottamisen jälkeen fiksoituja potilasnäytteitä tämänkaltaisia tutkimuksia olisi vaikea toteuttaa. Voidaan kuitenkin pohtia, onko oikein käyttää henkilön kudoksia tutkimuksen näytemateriaalina ilman hänen tietämystään tai suostumustaan.

Myös värjäystulosten arvioinnit julkaisimme anonymoineina. Arviointilomakkeen avoimeen kysymykseen saamiimme vastauksia olemme näin ollen referoineet ilman viitasta arvioinnin esittäjään. Olemme kuitenkin pyrkineet selkeästi erottamaan vastaajien esittämät ajatukset omasta pohdinnastamme.

8.3 Opinnäytetyöprosessi

Valitsimme tämän aiheen, koska halusimme päästä tekemään konkreettista työtä ja patologia on aiheena meitä molempia kiinnostava. Aiheen mielekkyyttä lisäsi se, että opinnäytetyöstä on tarkoitus olla käytännön hyötyä työn toimeksiantajalle Reagena Oy:lle. Reagenan edustaja oli ollut yhteydessä Tampereen ammattikorkeakouluun ja tiedustellut olisiko bioanalytiikko-opiskelijoilla kiinnostusta tehdä vertaileva värjäys Colen hematoksyliinin ja Mayerin hematoksyliinin välillä, jotta Reagena voisi virallisesti hyväksyä Colen hematoksyliinin IVD-tuotteeksi. Tässä opinnäytetyön aiheessa pääsimme syventämään teoretiamme histologisesta laboratorioprosessista erityisesti HE-värjäyksen osalta ja lisäksi saimme tehdä käytännön työtä kudosten leikkaamisen ja värjäämisen parissa.

Opinnäytetyöprosessin aluksi laadittiin opinnäytetyösuunnitelma, jota varten keskusteltiin työn tavoitteista ja tarkoituksesta toimeksiantajan kanssa. Toimeksiantaja toimitti tarvittavat väriliuokset ja Tampereen ammattikorkeakoulu kustansi muut tarvikkeet, kuten mikrotomien terät, objektilasit, ksyleenin ja etanolin. Vertailua varten tarvittiin myös kudosmateriaalia joko blokkeina tai valmiina laseina ja tätä varten yhteistyökumppaneita kyseltiin eri patologian laboratorioista. Kudosmateriaalin lisäksi oli tarpeellista saada myös asiantunteva arvio värjäyksistä. Yhteistyökumppaniksi saatiin solubiologi erään keskussairaalan patologian laboratorioista. Hän laati ja toimitti vertailua varten monikudosblokin, josta leikattiin värjättävät näytteet.

Käytännön toteutus aloitettiin loppuvuodesta 2017 harjoittelemalla mikrotomien käyttöä ja leikkeiden leikkausta Tampereen ammattikorkeakoulun patologian laboratoriossa opiskelijablokeilla. Harjoitusten jälkeen leikattiin varsinaiset näytteet monikudosblokista. Värjäykset Colen hematoksyliinillä ja Mayerin hematoksyliinillä suoritettiin samanaikaisesti ja molempia värjäyksiä tehtiin yhden kerran. Osa laseista toimitettiin solubiologeille arvioitaviksi. Opinnäytetyön kirjoitusprosessi aloitettiin alkuvuodesta 2018 ja valmis työ palautettiin ja esitettiin opinnäytetyöseminaarissa elokuussa 2018.

8.4 Tulosten tarkastelu

Käytännön osuuden toteuttaminen olisi voinut olla sujuvampaa, mikäli opintoihin kuuluva ohjattu harjoittelu patologian laboratoriossa olisi ollut suoritettuna ennen näytteiden leikkaamista ja värjäämistä. Varsinkin leikkaamisen osalta harjoittelusta olisi ollut hyötyä, sillä mikrotomin käyttö ja leikkaustekniikka kehittyvät enimmäkseen harjoituksen kautta.

Päätös käyttää samaa värjäysohjetta molemmilla hematoksyliineillä värjäämiseen ei ollut kaikkein optimaalisin ratkaisu lopputuloksen kannalta. Vertailu olisi ollut kuvaavampi, mikäli värjäykset olisi suoritettu erillisillä, nimenomaan kyseiselle hematoksyliinille optimoidulla värjäysohjeella. Värjäysprotokolla riippuu hematoksyliinin laadun lisäksi liuoksen pitoisuudesta, ja säätämällä värjäysmenetelmää itse oltaisiin voitu saavuttaa paras ja vertailukelpoisin lopputulos. Alusta alkaen itse toteutettu värjäyksen optimointi olisi kuitenkin vienyt huomattavasti aikaa, sillä se olisi edellyttänyt useita koevärjäyksiä, joissa oltaisiin muuteltu värjäysaikaa, väriliuosten pitoisuuksia, leikepaksuutta ja mahdollisesti huomioitu vielä erilaiset kudostyyppit. Tätä varten oltaisiin tarvittu myös enemmän kudostyypin materiaalia ja useampi blokki, jotta kudosten välinen vertailu olisi voitu toteuttaa. Lisäksi jokaisen koevärjäyksen tuotokset olisi pitänyt käyttää solubiologin tai patologin arvioitavana ennen kuin lopullinen ja optimaalisin värjäystulos olisi saavutettu. Yksinkertaisempi ratkaisu olisi tässä työssä voinut olla, että Mayerin hematoksyliinillä värjättäessä olisi käytetty Mayerille tarkoitettua, valmista värjäysohjetta ja Colen hematoksyliinille Colen ohjetta, kun nyt käytettiin kummallekin värille Colen värjäysohjetta.

Vaikka histologisia värjäysmenetelmiä on tutkittu runsaasti, vastaavaa vertailua eri hematoksyliinien välillä ei ole saatavilla julkisissa tietokannoissa. Usein histologisia värjäysmenetelmiä vertailevien tutkimusten lähtökohtana on verrata eri menetelmiä jonkin tietyn sairauden tai ilmiön havaitsemiseksi kudoksenäytteistä. Tällöin on tyypillisesti verrattu eri menetelmien spesifisyyttä ja/tai sensitiivisyyttä. Spesifisyys tarkoittaa diagnostiikassa oikeiden negatiivisten tulosten osuutta terveistä tutkittavista, eli todennäköisyyttä, jolla kyseisellä menetelmällä terve todetaan terveeksi (Lääketieteen sanasto 2018b). Sensitiivisyys puolestaan tarkoittaa oikeiden positiivisten tulosten osuutta sairaista tutkittavista, eli todennäköisyyttä, jolla kyseisellä menetelmällä sairas todetaan sairaaksi (Lääketieteen sanasto 2018c).

Esimerkiksi Wisniewski, Wen ja Kim (1989) vertasivat tutkimuksessaan neljän eri värjäysmenetelmän sensitiivisyyttä aivokudoksen plakkien havaitsemiseksi sellaisten henkilöiden aivokudoksenäytteistä, joilla oli todettu Alzheimerin tauti tai Downin syndrooma. Rotimi, Cairns, Gray, Moayyedi ja Dixon (2000) puolestaan vertasivat neljän eri värjäysmenetelmän saatavuutta, toistettavuutta, nopeutta, sensitiivisyyttä ja taloudellisuutta *Helicobacter pylorin* havaitsemiseksi mahabiopsianäytteistä.

Tässä tutkimuksessa ei verrattu hematoksyliinejä siltä kannalta, kuinka hyvin ne HE-värjäyksessä sopivat jonkin tietyn sairauden diagnosointiin, vaan haluttiin arvioida värjäys-tuloksia yleisemmällä tasolla. Värjätyt näytteetkin olivat benignejä, eikä niistä siis etsitty mitään poikkeavaa. Näistä syistä emme voineet tutkimuksessamme verrata värjäysmenetelmien spesifisyyttä ja sensitiivisyyttä, vaan arvioinnin kohteena olivat visuaalisesti havaittavat ominaisuudet.

Tavoitteiltaan ja menetelmältään samantyyppisen tutkimuksen erilaisista HE-värjäyksistä ovat julkaisseet Madhuri ja Priya (2011), jotka vertailivat kokeellisessa tutkimuksessaan perinteistä ja ksyleeni- ja metanolivapaata hematoksyliini-eosiinivärjäystä. Ksyleenin tilalla käytettiin laimennettua astianpesuainetta näytteiden deparafinointiin. Tutkimuksessa värjättiin 60 kudoksenäytettä perinteisellä HE-värjäyksellä ja 60 näytettä ksyleeni- ja metanolivapaalla HE-värjäyksellä, minkä jälkeen suun sairauksiin erikoistunut patologi arvioi näytteitä pisteyttämällä ne eri ominaisuuksien suhteen. Pisteytystapana oli antaa näytteelle kunkin ominaisuuden suhteen joko arvo 1 (riittävä/läsnä) tai arvo 0 (riittämä-

tön/puuttuva). Arvioitavia ominaisuuksia olivat tumavärjäytyminen, sytoplasman värjäytyminen, tasaisuus, kirkkaus ja selkeys. Lisäksi arvioitiin muun muassa menetelmien taoudellisuutta, ekologisuutta ja työturvallisuutta.

8.5 Johtopäätökset ja jatkotutkimusaiheet

Tutkimuksen johtopäätöksenä voidaan todeta, että Colen hematoksyliini soveltuu hyvin tutkimuksessa tarkasteltujen kudosten värjäämiseen. Tutkimuksesta ei kuitenkaan voida vetää sitä johtopäätöstä, että Colen hematoksyliini soveltuisi kudosten värjäämiseen Mayerin hematoksyliiniä paremmin. Vaikka Colen hematoksyliinillä värjätyt näytteet keskimäärin saivatkin parempia arvioita, on huomioitava, että värjäysohje luultavasti oli Colen hematoksyliinille optimaalisempi kuin Mayerin hematoksyliinille.

Jatkotutkimuksena aiheesta voitaisiinkin tehdä vertailu, jossa kudoksia värjättäisiin eri hematoksyliineillä käyttäen kullekin hematoksyliinille optimoitua värjäysprotokollaa. Näin voitaisiin saada entistä parempi käsitys hematoksyliinien välisistä eroista silloin, kun värjäysohjelmat ovat kullekin väriaineelle optimaaliset. Myös useampien kudosten värjäytymistä voitaisiin tarkastella käyttämällä laajempaa kudospacea.

Värjäysprotokollan optimointi voisi olla oma jatkotutkimusaiheensa myös ilman varsinaista hematoksyliinien tai muiden värien keskinäistä vertailua. Jatkotutkimuksen voisi toteuttaa suunnitteleamalla optimoitu värjäysprotokolla erilaisille kudoksille. Opinnäyte-työmme värjäystulosten arvioinnissa ilmeni, että jotkin kudokset värjäytyivät erilaisella intensiteetillä kuin toiset, vaikka ne värjättiin samalla lasilla. Värjäysprotokollan optimointi erilaisille kudoksille olisi jo varsin laaja ja mielenkiintoinen tutkimusaihe yhdellä valitulla värjäysmenetelmällä. Optimointia varten olisi oleellista tehdä yhteistyötä useasta solubiologista/patologista koostuvan arviointiryhmän kanssa, jotta arvioinneista olisi mahdollista tehdä objektiivinen yhteenveto, jossa arvioijien henkilökohtaiset visuaaliset preferenssit olisi karsittu minimiin.

LÄHTEET

Bancroft, J. D., Layton, C., & Suvarna, S. K. 2012. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7. painos. Elsevier.

Clark, G. 1981. Methods for General Tissue. Teoksessa Clark, G. (toim.) Staining Procedures. Fourth Edition. Baltimore: Williams & Wilkins.

Ellis, R. C. 2002. Problems in histopathological technique. Problem no 16. ICH World, LLC. Luettu 22.2.2018.

<http://www.ichworld.com/royellis/problems/problem16.htm>

Euroopan Parlamentin ja Neuvoston asetus (EU) 2017/746. 5.4.2017. In vitro -diagnostiikkaan tarkoitetuista lääkinnällisistä laitteista sekä direktiivin 98/79/EY ja komission päätöksen 2010/227/EU kumoamisesta. 1 jakso: soveltamisalat ja määritelmät. 2 artikla, määritelmät. Luettu 27.2.2018

[http://eurlex.europa.eu/legalcon-](http://eurlex.europa.eu/legalcontent/FI/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2017.117.01.0176.01.FIN&toc=OJ:L:2017:117:TOC)

[tent/FI/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2017.117.01.0176.01.FIN&toc=OJ:L:2017:117:TOC](http://eurlex.europa.eu/legalcontent/FI/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2017.117.01.0176.01.FIN&toc=OJ:L:2017:117:TOC)

Gill, G. W. 2010. H&E Staining: Oversight and Insights. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology. Education guide. Special Stains and H & E. Luettu 21.2.2018. www.dako.com/fi/08066_guide_to_special_stains.pdf.

Heikkilä, T. 2010. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita Prima Oy.

Hirsjärvi S., Remes P. & Sajavaara P. 2009. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Horobin, R.W. & Bancroft, J.D. 1998. Troubleshooting Histology Stains. Churchill Livingstone.

Horobin, R. W. 2012. How histological stains work. Teoksessa Suvarna, S. K., Layton, C. & Bancroft, J. D. (toim.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone.

Juinqueria, L. C. & Carneiro, J. 2005. Basic Histology. The McGraw-Hill Companies.

Kananen, J. 2011. Kvantti: Kvantitatiivisen opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisu 118.

Kiernan, J.A., 1999. Histological & Histochemical Methods, Theory and Practice. 3. painos. Arnold.

Lääketieteen sanasto 2018a. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 3.3.2018. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01158

Lääketieteen sanasto 2018b. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 22.7.2018. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt03206

Lääketieteen sanasto 2018c. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 22.7.2018. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt03075

Madhuri, R. A. & Priya, S. J. 2011. A study to evaluate the efficacy of xylene-free hematoxylin and eosin staining procedure as compared to the conventional hematoxylin and eosin staining: An experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. Medknow Publications. US National Library of Medicine. Luettu 24.7.2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329695/>

Mäkinen, M. 2012. Kudosnäytteiden eri tyypit. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Mäkinen, M. & Karhunen, P. J. 2012a. Lääketieteellinen ruumiinavaus. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Mäkinen, M. & Karhunen, P. J. 2012b. Ruumiinavaukset. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) *Patologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Nowacek, J. M. & Kiernan, J. A. 2010. Fixation and Tissue Processing. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) *Special Stains and H & E*. 2.painos. Education Guide. Carpinteria: Dako North America.

Orchard G. & Nation, B. 2012. *Histopathology (fundamentals of biomedical science)*. Oxford University Press.

Reagena Oy 2018a. Reagena. Luettu 3.3.2018. <https://www.reagena.com/fi/yritys/>

Reagena Oy 2018b. Tutkimus ja tuotekehitys. Luettu 3.3.2018. <https://www.reagena.com/fi/yritys/tutkimus-ja-tuotekehitys/>

Roche Diagnostics Oy 2017. Diagnostiikka. Luettu 27.2.2018. <https://www.roche.fi/home/diagnostiikka.html>

Ross, M. H. & Wojciech, P. 2011. *Histology: A Text and Atlas, with correlated cell and molecular biology*. 6. painos. Wolters Kluwer, LWW.

Rotimi, O., Cairns, A., Gray, S., Moayyedi, P. & Dixon, M. F. 2000. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. *Journal of Clinical Pathology*. Volume 53, issue 10. Association of Clinical Pathologists. BMJ Publishing Group Ltd. Luettu 27.7.2018. <https://jcp.bmj.com/content/53/10/756.info>

Ståhlberg, Tom. 2015. 2.13.3 IVD-laitteen määritelmä. Teoksessa: *Terveystuotteiden lakisäätöiset määräykset kansainvälisillä markkinoilla*. Suomi ja EU fokuksessa. Helsinki: Tekes. Luettu 27.2.2018.

https://www.businessfinland.fi/globalassets/julkaisut/terveydenhuollon_laitteiden_lakisäätöiset_maaraykset_opas.pdf?_t_id=1B2M2Y8AsgTpgAmY7PhCf%3d%3d&_t_q=Terveystuotteiden+laitteiden+lakisäätöiset+määräykset++kansainvälisillä+markkinoilla&_t_tags=language%3afi%2csiteid%3a53b34a16-7ce7-4ab0-8c7e-

f06c83547e28&_t_ip=109.204.185.189&_t_hit.id=Finpro_Web_Features_Publications_PublicationPage/_d6944f2f-54bc-4695-8126-f45a33abc208_fi&_t_hit.pos=1

Valli, R. 2010. Kyselylomaketutkimus. Teoksessa Aaltola, J. & Valli, R. (toim.) Ikku-noita tutkimusmetodeihin I. Metodien valinta ja aineiston keruu: virikkeitä aloittelevalle tutkijalle. Jyväskylä: PS-kustannus.

Wisniewski, H.M., Wen, G.Y. & Kim, K.S. 1989. Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag. Luettu 27.7.2018. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00687398>

Wittekind, D. 2003. Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain. *Biotechnic & Histochemistry*. Volume.78. 261-270.

Woods, A. E. 1994. Haematoxylin and counterstains. Teoksessa Woods, A. E. & Ellis, R. C. (toim.) *Laboratory Histopathology. A Complete Reference*. Churchill Livingstone.

LIITTEET**Liite 1 Arviointilomake Colen hematoksyliinillä värjäytyille näytteille**

COLEN HEMATOKSYLIINILLÄ VÄRJÄTTYJEN NÄYTTEIDEN ARVIOINTI

MERKITSE TAULUKKON KUNKIN KUDOKSEN KOHDALLE ARVIO NUMEROLLA 1-5

1 Huono

2 Välttävä

3 Tyydyttävä

4 Hyvä

5 Erinomainen

	Tonsilla	Appen- dix	Munu- ainen	Iho	Maksa	Haima	Is- tukka
Kuinka hyvin kudoksen rakenne erottuu?							
Kuinka hyvin tuman rakenteet erottuvat?							
Millainen on tumien ja muun kudoksen välinen kontrasti?							
Kuinka hyvin värjäys soveltuu kudoksen tarkasteluun?							

Sanallinen arvio Colen hematoksyliinillä tehdystä värjäyksestä:

Liite 2 Arviointilomake Mayerin hematoksyliinillä värjäytyille näytteille

MAYERIN HEMATOKSYLIINILLÄ VÄRJÄTTYJEN NÄYTTEIDEN ARVIOINTI

MERKITSE TAULUKKOOON KUNKIN KUDOKSEN KOHDALLE ARVIO NUMEROLLA 1-5

1 Huono

2 Välttävä

3 Tyydyttävä

4 Hyvä

5 Erinomainen

	Tonsilla	Appen- dix	Munu- ainen	Iho	Maksa	Haima	Is- tukka
Kuinka hyvin kudoksen rakenne erottuu?							
Kuinka hyvin tuman rakenteet erottuvat?							
Millainen on tumien ja muun kudoksen välinen kontrasti?							
Kuinka hyvin värjäys soveltuu kudoksen tarkasteluun?							

Sanallinen arvio Mayerin hematoksyliinillä tehdystä värjäyksestä: