



PAS-VÄRJÄYKSET HISTOLOGIASSA – ARTEFAKTAT JA OPTIMOINTI

PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäysten
optimointi Vaasan keskussairaalan
patologian osastolla

Sonja Nousiainen

Jenni Tynjälä

Opinnäytetyö
Lokakuu 2013
Bioanalytiikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikka
10SBIO

SONJA NOUSIAINEN & JENNI TYNJÄLÄ:

PAS-värjäykset histologiassa – artefaktat ja optimointi

PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäysten optimointi Vaasan keskussairaalan patologian osastolla

Opinnäytetyö 56 sivua, joista liitteitä 4 sivua

Lokakuu 2013

Merkittävä osa patologian laboratorion toiminnasta koostuu kudosten histologisesta tutkimisesta. Kudosnäytteet prosessoidaan siten, että niistä saadaan ohuita leikkeitä, jotka värjätään mikroskooppista tarkastelua varten. Värjäyksiä on lukuisia erilaisia ja niistä jokainen tuo näytteestä esille tiettyjä kudskomponentteja. PAS- eli perjodihappo-Schiff-värjäykset ovat histologisia erikoisvärjäyksiä, joilla osoitetaan lima-aineita.

Opinnäytetyön aihe saatiin Vaasan keskussairaalan patologian osastolta, jossa PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäyksissä on esiintynyt mikroskooppista tarkastelua hankaloittavia artefaktoja. Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida nämä värjäykset Tissue-Tek® DRS 2000 -värjäysautomaatille. Työn tavoitteena oli kyseisten värjäysten laadun parantaminen.

Tämä opinnäytetyö toteutettiin kokeellisena tutkimuksena, jonka aineisto koostui PAS-värjäyksillä osoitettavaa materiaalia sisältävistä potilas- ja obduktionäytteistä. Optimointia tehdessä käytetyt näytteet identifioitiin siten, ettei potilaita voida niiden perusteella tunnistaa. Opinnäytetyössä tutkittiin, miten hematoksyliinin vaihtaminen toiseen, inkubaatioaikojen muuttamien ja väriliuosten koostumusten muuttaminen vaikuttavat värjäystulokseen. Optimointi aloitettiin PAS-värjäyksestä, sillä se on pohjana D-PAS- ja AB-PAS-värjäyksille. Testivärjäykset tehtiin ensin käsin, minkä jälkeen parhaan värjäystuloksen antaneen värjäysohjelman toimivuus testattiin värjäysautomaatilla. Värjäystuloksia arvioivat Vaasan keskussairaalan patologian osaston sairaalasolubiologi ja patologit.

Optimoinnilla onnistuttiin parantamaan PAS-värjäysten värjäystulosten laatua ja värjäyksistä saatiin poistettua aiemmin tulkintaa häirinneet artefaktat. Merkittävin tekijä värjäystulosten paranemisen kannalta oli Weigertin hematoksyliinin vaihtaminen Mayerin hematoksyliiniin. Myös inkubaatioaikojen muutoksilla saatiin parannettua värjäystuloksia, mutta perjodihapon pitoisuuden muutos ei vaikuttanut värjäystulokseen. Saatujen tulosten perusteella Vaasan keskussairaalan patologian osastolla voidaan siirtyä käyttämään uudistettuja värjäysohjelmia ja Mayerin hematoksyliiniä. Mikäli jatkossa histologisissa värjäyksissä havaitaan värjäystulosten tason laskua, ehdotetaan jatkotutkimusaiheena kyseisten värjäysten optimointia.

Asiasanat: histologia, erikoisvärjäykset, PAS, D-PAS, AB-PAS, artefaktat, optimointi

ABSTRACT

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

SONJA NOUSIAINEN & JENNI TYNJÄLÄ:
PAS Stainings in Histology – Artefacts and Optimization
Optimizing PAS, D-PAS and AB-PAS Stainings for the Department of Pathology at
Vaasa Central Hospital

Bachelor's thesis 56 pages, appendices 4 pages
October 2013

The periodic acid - Schiff (PAS) stainings are perhaps the most widely used techniques for the demonstration of carbohydrates in histopathology. In the department of pathology at Vaasa Central Hospital where this study was performed some artefacts have appeared in tissue sections stained with PAS stainings. The objective of this study was to optimize PAS, D-PAS and AB-PAS stainings for Tissue-Tek® DRS 2000 automated staining instrument. The purpose was to improve the quality of these stainings for easier interpretation of slides.

The theoretical section explores essential artefacts and problems that might occur during staining with PAS, D-PAS or AB-PAS. The theory section also examines histological tissue processing and the molecular basis of PAS stainings. The optimization was carried out as an empirical study. The research problems handled whether another haematoxylin, change in incubation times or different concentration of periodic acid had an effect on improving the quality of stainings.

The results indicate that by replacing home-made Weigert's haematoxylin with Mayer's haematoxylin and by making small changes in incubation times good staining results were obtained. The change in periodic acid concentration showed no effect on staining results. As a conclusion Mayer's haematoxylin and new staining protocols will be adopted for routine use in the department of pathology at Vaasa Central Hospital.

Key words: histology, special stains, PAS, D-PAS, AB-PAS, artefacts, optimization

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	HISTOLOGINEN KUDOSPROSESSI	8
2.1	Näytteenotto, fiksaatio ja dissektointi	8
2.2	Kudoskuljetus, valu ja leikkaus	9
2.3	Värjääminen, päällystys ja mikroskopointi	9
3	OPTIMOITAVAT VÄRJÄYKSET JA VÄRJÄYSAUTOMAATTI.....	11
3.1	PAS-värjäys	11
3.2	D-PAS-värjäys	13
3.3	AB-PAS-värjäys	14
3.4	Tumaväri PAS-värjäyksissä.....	16
3.5	Värjäysautomaatti Tissue-Tek® DRS 2000	18
4	ARTEFAKTAT HISTOLOGISISSA NÄYTTEISSÄ.....	19
4.1	Näytteenotossa, näytteen käsittelyssä ja fiksaatiossa syntyvät artefaktat.....	19
4.2	Dissektion, kudoskuljetuksen ja valamisen aikana syntyvät artefaktat	21
4.3	Leikkaamisessa ja leikkeen kiinnittämisessä syntyvät artefaktat	22
4.4	Värjäyksissä syntyvät artefaktat	23
4.5	Päällystämässä ja varastoinnissa syntyvät artefaktat	25
5	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA ONGELMAT	26
6	OPINNÄYTETYÖN MENETELMÄ JA AINEISTO	27
6.1	Menetelmä	27
6.2	Optimoinnissa käytettävät näytteet	28
7	OPTIMOINNIN TOTEUTTAMINEN	30
7.1	Alkuvalmistelut ennen optimointia.....	30
7.2	Optimointi	30
7.3	PAS-värjäyksen optimointi.....	32
7.3.1	D-PAS-värjäyksen optimointi.....	34
7.3.2	AB-PAS-värjäyksen optimointi	35
8	TULOKSET	38
8.1	PAS-värjäyksen optimoinnin tulokset	38
8.2	D-PAS-värjäyksen optimoinnin tulokset	40
8.3	AB-PAS-värjäyksen optimoinnin tulokset	42
8.4	Yhteenveto tuloksista.....	44
9	POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	46
9.1	Etiikka ja luotettavuus	46
9.2	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset.....	47
	LÄHTEET.....	50

LIITTEET	53
Liite 1. PAS-optimoinnin värjäysohjelmat.....	53
Liite 2. D-PAS-optimoinnin värjäysohjelmat.	54
Liite 3. AB-PAS-optimoinnin Testi 3:n värjäysohjelmat.....	55
Liite 4. AB-PAS-värjäyksen Testi 7:n värjäysohjelmat.	56

1 JOHDANTO

Patologia eli tautioppi tutkii sairauksien aiheuttamia rakenteellisia ja toiminnallisia muutoksia solu-, kudosis- ja elimistötasolla. Diagnostisessa patologiassa selvitetään elimistön muutoksia ja näitä tutkitaan kliinisen patologian laboratoriossa. Patologian laboratoriossa tehdään histologista eli kudospillista ja sytologista eli soluopillista tutkimusta sekä obduktioita eli ruumiinavauksia. (Mäkinen & Lehto 2012, 10–12.)

Patologian merkitys on nykyaikana korostunut etenkin syöpädiagnostiikassa ja erilaisien tulehduksellisten tilojen selvittelyssä. Potilaan histologisia ja sytologisia näytteitä tutkimalla pyritään selvittämään, onko kudosis- tai solutasolla nähtävissä tiettyyn sairauteen sopivia muutoksia. Joissain tapauksissa patologia voi auttaa myös sairauden mekanismin selvittämisessä. Patologi antaa näytteestä lausunnon, joka ohjaa klinikkoo diagnoosin teossa ja tarvittavan hoidon valinnassa. (Anderson 2011; Mäkinen & Lehto 2012, 12–14.)

Histologisista näytteistä valmistetaan objektilasille ohuita leikkeitä, jotka on värjättävä, jotta näitä muutoin läpinäkyviä kudosisleikkeitä voidaan tutkia mikroskoopissa (Anderson 2011). Histologisia värjäyksiä on useita erilaisia ja ne jaetaan perus- ja erikoisvärjäyksiin. PAS-värjäykset, joita ovat PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäykset, kuuluvat yleisimmin käytettyjen histologisten erikoisvärjäysten joukkoon. (Bancroft & Gamble 2002, 178–179, 181; Kiernan 2008, 304; Myers 2009; Kiernan 2010a, 81–82.) PAS- eli perjodihappo-Schiff-värjäystä käytetään glykokeenin ja neutraalien limojen osoittamiseen (Luna 1992, 375; Bancroft & Gamble 2002, 175; Kiernan 2008, 294; Myers 2009; Kiernan 2010a, 82). D-PAS-värjäystä käytetään osoittamaan neutraalit limat, sillä diastaasi pilkkoo näytteen glykokeenin (Cook 1974, 153; Saxena 2010, 113). AB-PAS-värjäyksessä näytteet käsitellään happamat limat värjäävässä Alcian bluessä ennen PAS-värjäysosuutta, jotta happamat ja neutraalit limat voidaan erottaa toisistaan (Bancroft & Gamble 2002, 178–179, 181; Kiernan 2008, 304; Myers 2009; Kiernan 2010a, 81).

Näytteen prosessoinnin kaikki vaiheet vaikuttavat kudosisnäytteen laatuun ja värjäytyvyyteen. Histologisen prosessoinnin aikana syntyy näytteeseen muutoksia eli artefakteja. Jotta värjäystulokset pysyisivät hyvinä, kerrasta toiseen samoina ja vertailukelpois-

na, on myös artefaktat pyrittävä pitämään vakioina. Tämä edellyttää kerrasta toiseen mahdollisimman samanlaisena toistuvaa kudoksenäytteiden prosessointia. (Wallington 1979, 3; Bancroft & Gamble 2002, 85.)

PAS-värjäykset ovat Vaasan keskussairaalan patologian osastolla yleisiä histologisia erikoisvärjäyksiä ja niitä tehdään lähes päivittäin. Tämän työn tarkoituksena on optimoida Vaasan keskussairaalan patologian osaston PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäykset Tissue-Tek® DRS 2000 -värjäysautomaatille. Ulkoisilla laadunarviointikierroksilla näistä värjäyksistä saadut testitulokset ovat olleet hyviä tai lähes moitteettomia. Värjäyksissä on esiintynyt jonkin verran tulkintaa vaikeuttavaa sakkaa, yli- tai alivärjäytymistä ja värien epätasapainoa. Työn tavoitteena on histologisten leikkeiden PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäysten värjäystulosten laadun parantaminen siten, että värjäystulokset olisivat erinomaisia. Työn teoriatausta käsittelee optimoitavia värjäyksiä, niillä värjättävien kudoksenäytteiden prosessointia ja näissä värjäyksissä mahdollisesti esiintyviä artefakteja.

2 HISTOLOGINEN KUDOSPROSESSI

Patologian osaston histologian laboratoriossa tutkitaan kudosnäytteitä mikroskopoimalla, yrittäen selvittää solujen ja kudosten toimintaa ja sitä, miten ne toimivat yhteistyössä. Kudosnäytteitä käsitellään siten, että ne näyttäisivät elimistön tutkittavaksi halutun kohdan sellaisena kuin se elävänä kudoksena on. Näytteiden mikroskooppisen tarkastelun tarkoituksena on selvittää, onko kudoksessa normaalista poikkeavia muutoksia ja millaisia nämä muutokset ovat. (Rolls 2011; Beresford 2013.)

2.1 Näytteenotto, fiksaatio ja dissekointi

Histologiset näytteet vaihtelevat leikkauksien yhteydessä poistetuista kokonaisista elimistä pieniin biopsioihin eli koepaloihin. Näitä näytteitä voidaan ottaa eri tavoin tilanteesta riippuen, esimerkiksi ihosta voidaan ottaa stanssibiopsia, maksasta karkeaneulanäyte tai leikkauksen yhteydessä osa suolesta voidaan poistaa näytteeksi. (Aho 1989, 5; Bancroft & Gamble 2002, 81; Rolls 2011.)

Histologisen näytteen käsittely alkaa fiksaatiolla, jonka tärkein tehtävä on säilyttää kudokset mahdollisimman samankaltaisena kuin se elävänä on ollut. Fiksaatio estää kudoksen autolyysin eli hajoamisen inaktiivomalla solujen lysosomaaliset entsyymit ja tekemällä makromolekyylit liukenemattomiksi. Lisäksi sillä estetään kudoksen mätänemistä aiheuttavien ja muiden bakteerien sekä homeiden kasvu. Fiksaation aikana kudoksen tulisi säilyttää muotonsa ja tilavuutensa. Fiksaatiokäsittelyn on mahdollistettava näytteen myöhempi leikkaaminen ohuiksi leikkeiksi sekä leikkeiden värjääminen. Yleensä näytteet siirretään fiksatiiviin jo näytteenoton yhteydessä. (Aho 1989, 5; Bancroft & Gamble 2002, 63; Nowacek 2010, 141; Rolls 2011.)

Fiksoituneet näytteet dissekoidaan eli näytteistä leikataan edustavia näytepaloja halutuista kohdista. Samalla näytteet tutkitaan makroskooppisesti ja niiden tärkeimmät tiedot, kuten mitat, dokumentoidaan. Valitut näytepalat kasetoidaan jatkokäsittelyä varten. Pienet näytteet voidaan kasetoida sellaisinaan ilman dissekointia. (Aho 1989, 5; Rolls 2011.)

2.2 Kudoskuljetus, valu ja leikkaus

Dissekoinnin jälkeen, ennen parafiiniin valamista, on histologisen näytteen prosessointivaiheita, joita kutsutaan kudoskuljetukseksi. Kudoskuljetuksen tarkoituksena on poistaa näytteestä vesi ja korvata se tukiaineella, joka rutiinihistologiassa on parafiini. Kudoskuljetuksen aluksi näyte dehydroidaan eli siitä poistetaan vesi nousevalla alkoholisarjalla. Seuraavaksi näyte kirkastetaan ksyleenillä, jonka valontaittoindeksi on lähellä proteiinien valontaittoindeksiä. Kun ksyleeni on täysin korvannut alkoholin, on kudος läpikuultava. Lopuksi näyte siirretään parafiiniin. (Wallington 1979, 30; Aho 1989, 11–12; Bancroft & Gamble 2002, 86–87, 89.) Parafiinin tehtävänä on tukea kudosta ja mahdollistaa ohuiden leikkeiden leikkaaminen. Tukiaineen on kuitenkin oltava niin pehmeää, ettei leikatessa kudος tai mikrotomin terä vahingoitu (Bancroft & Gamble 2002, 86).

Tukiaineeseen siirretystä näytteestä tehdään näyteblokki valamalla näyte parafiiniin (Bancroft & Gamble 2002, 89). Valamisen tarkoituksena on ympäröidä näyte parafiinilla, joka tukee näytettä leikkaamisen aikana (Thompson & Luna 1978, 85). Valamisessa on tärkeää suunnata näytepala siten, että siitä leikatut leikkeet ovat edustavia. Parafiiniblokista leikataan muutamien mikrometrien paksuisia leikkeitä mikrotomilla. Leikkaaminen aloitetaan trimmaamalla näyte eli leikkaamalla ylimääräinen parafiini näytteen päältä pois siten, että näyte on kokonaan esillä. Tämän jälkeen blokista leikataan varsinaiset näyteleikkeet. Näytteiksi valitut leikkeet siirretään varovasti kylmään veteen, josta ne poimitaan järjestyksessä objektilasille. Kylmän veden jälkeen leikkeitä käytetään lämpimässä vedessä, jossa ne oikenevat. Tämän jälkeen leikkeet poimitaan takaisin lasille, lasi kuivatetaan ja leikkeet kiinnitetään lasille lämmön avulla. (Aho 1989, 14–15; Bancroft & Gamble 2002, 89, 94–98; Nowacek 2010, 151.)

2.3 Värjääminen, päällystys ja mikroskopointi

Laseille kiinnitetyistä leikkeistä on poistettava parafiini ja niihin on palautettava vesi, jotta näytteiden värjääminen olisi mahdollista (Anderson 2011). Näytteet värjätään, jotta näytteen kudος- ja solukomponenttien välille saadaan kontrastia ja niitä voidaan tarkastella mikroskoopissa. Histologiset värjäykset jaetaan perus- ja erikoisvärjäyksiin, joista

perusvärjäyksellä saadaan esille kudosten yleismorfologia, mutta sillä ei pystytä erottamaan kaikkia kudoksissa olevia osia toisistaan. Yleisesti histologisena perusvärjäyksenä käytetään hematoksyliini-eosiini- eli HE-värjäystä. (Bancroft & Gamble 2002, 125; Kiernan 2008, 4, 141; Floyd 2010, 39; Kiernan 2010b, 29; Kumar & Gill 2010, 1; Anderson 2011.)

Perusvärjäyksen lisäksi tarvitaan myös erikoisvärjäyksiä, joiden avulla voidaan tutkia, esiintyykö kudoksissa tiettyjä rakenteita tai komponentteja, missä kohdassa kudosta tai solua ne mahdollisesti sijaitsevat ja paljonko niitä on (Kumar & Gill 2010, 1). Kunkin näytteen kohdalla tarvittavien erikoisvärjäysten valintaa ohjaavat potilaan esitiedot, näyttemateriaali ja joskus myös HE-värjätyn leikkeen morfologinen tarkastelu. Erikoisvärjäykset jaetaan usein niiden käyttötarkoituksen ja värjäyskohteen mukaan nukleiinihappo-, hiilihydraatti-, sidekudos-, mineraali- ja mikro-organismivärjäyksiin. (Floyd 2010, 39; Kumar & Gill 2010, 1, 4.)

Värjäyksen jälkeen näytelasit päällystetään eli näytteen päälle kiinnitetään päällystysaineen avulla ohut peitinlasi tai -kalvo. Päällystysaineen ja lasin valontaittoindeksien on oltava lähellä toisiaan eikä päällystysaine saa liuottaa leikkeestä väriä. (Aho 1989, 15; Kumar & Gill 2010, 1; Beresford 2013.)

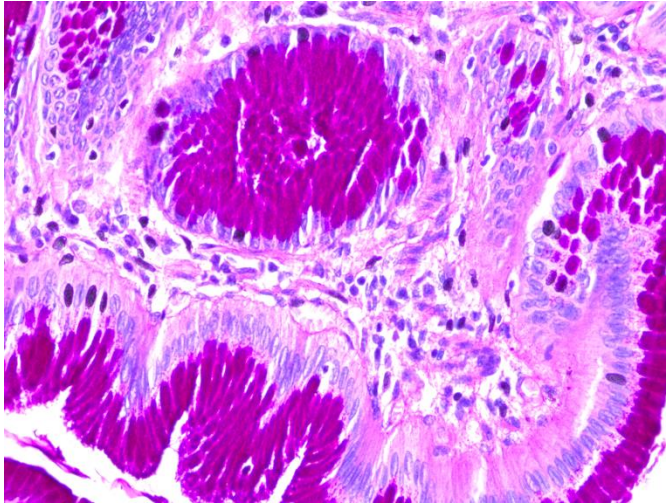
Valmiiden näytelasien mikroskooppisen tarkastelun ja tulkinnan tekee siihen koulutettu lääkäri, patologi. Kudoserakenteita tarkastelemalla tehtävä tulkinta perustuu katsomalla havaittuihin kuvioihin ja niiden tunnistukseen. Tämän vuoksi histopatologinen tutkimus on aina subjektiivista. (Bancroft & Gamble 2002, 729.) Hyvä tulkitsija osaa erottaa toisistaan kudosisprosessin näytteeseen aikaansaamat vaikutukset ja kuvan muodostumiseen vaikuttavat asiat, kuten leikkeen paksuus ja mikroskoopin puhtaus. Lisäksi hyvä tulkitsija pystyy ottamaan kantaa siihen, onko valmis näyte teknisesti onnistunut ja tarkoitukseenmukainen. Teknisesti onnistuneessa näytteessä ei ole kudosisprosessoinnissa syntyneitä odottamattomia virheitä tai puutteita. Tarkoituksenmukaisessa näytteessä voi olla teknisiä puutteita, mutta siitä voidaan silti tehdä luotettava tulkinta. (Gill 2010, 180.)

3 OPTIMOITAVAT VÄRJÄYKSET JA VÄRJÄYSAUTOMAATTI

PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäykset kuuluvat histologisten erikoisvärjäysten hiilihydraattivärjäykseen (Bancroft & Gamble 2002, 163). Hiilihydraatti on yleisnimi sokereille ja niistä muodostuneille suurimolekyylisille yhdisteille (Lääketieteen termit 2011). Histologisista leikkeistä hiilihydraattivärjäyksillä osoitetaan lima-aineita (engl. mucosubstance), joihin kuuluvat glykaanit eli polysakkaridit ja glykokonjugaatit. Glykokonjugaatti on hiilihydraatin ja proteiinin tai lipidin muodostama molekyyli ja niitä ovat esimerkiksi glykoproteiinit ja proteoglykaanit. Kirjallisuudessa hiilihydraattitermeissä esiintyy ristiriitaa ja esimerkiksi laajasti käytetyn termin musiini (engl. mucin) määrittelmä vaihtelee. (Bancroft & Gamble 2002, 163; Kiernan 2008, 274; Kiernan 2010a, 75.) PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäykseen yhdistetään yleensä tumavärjäys hematoksyliinillä. Hematoksyliinejä on useita erilaisia ja ne jaotellaan käytettävän peittäusaineen eli mordantin mukaan. (Bancroft & Gamble 2002, 125, 127, 173, 175, 181; Kiernan 2008, 293, 305.)

3.1 PAS-värjäys

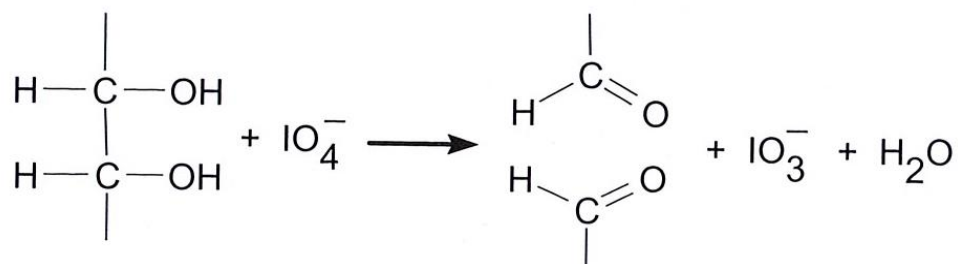
PAS- eli perjodihappo-Schiff-värjäys on yksi yleisimmin käytetyistä erikoisvärjäyksistä histopatologiassa (Kiernan 2010a, 82). Se on myös hiilihydraattivärjäyksistä käytetyin menetelmä (Chayen, Bitensky & Butcher 1973, 70–72; Myers 2009). PAS värjää glykogeenin ja neutraalit limat purppuranpunaisiksi (Luna 1992, 375; Bancroft & Gamble 2002, 175; Kiernan 2008, 294; Myers 2009; Kiernan 2010a, 82) (kuva 1). PAS-värjäystä käytetään muun muassa maksa-, munuais- ja ihonäytteiden värjäämiseen sekä sienten osoittamiseen kudoksenäytteistä (Bancroft & Gamble 2002, 335; Brown & Smoller 2010, 199; Haque 2010, 233; Kiernan 2010a, 82; Saxena 2010, 107). Lisäksi maha-suolikanavassa ja ylemmissä hengitysteissä on neutraaleja lima-aineita erittäviä, PAS-positiivisesti värjäytyviä soluja (Naukkarinen 2000, 154–155). PAS-värjäyksestä on hyötyä myös kasvaindiagnoosissa, sillä sen avulla voidaan osoittaa neutraaleja limoja tai glykogeenia erittäviä kasvainsoluja kudoksenäytteistä (Naukkarinen 2000, 154; Bancroft & Gamble 2002, 169; Kiernan 2010a, 82; Iwase, Masuda, Suzuki, Takahashi & Miyazaki 2013, 2).



KUVA 1. PAS-värjätty ileumnäyte, jossa neutraalit limat näkyvät purppuranpunaisina

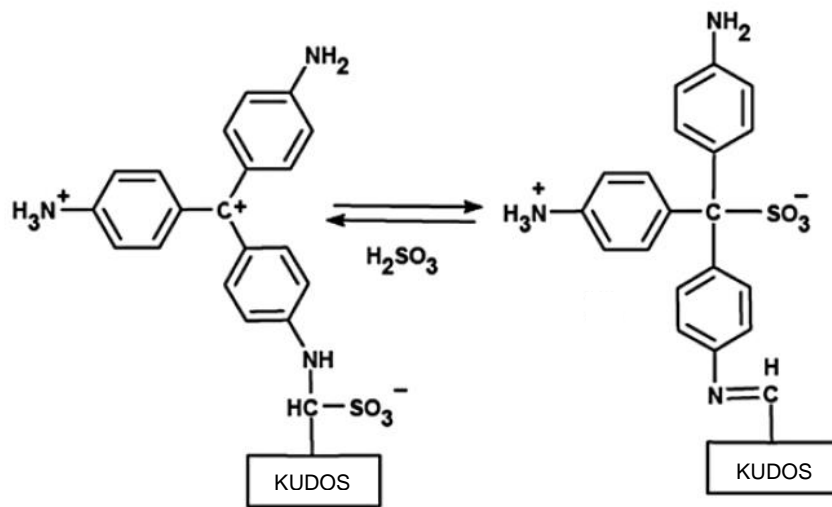
PAS-värjäyksessä näyte käsitellään aluksi perjodihapolla, joka hapettaa näytteen glykolit aldehydeiksi ja nämä muodostavat värillisen yhdisteen reagoidessaan Schiffin reagenssin kanssa. Tämän jälkeen tumat vastavärjätään halutulla hematoksyliinillä, kuten Harrisin, Weigertin tai Mayerin hematoksyliinillä. (Bancroft & Gamble 2002 173–175; Kiernan 2008, 288, 293.)

Perjodihappoa käytetään yleensä 0,5 % tai 1 % vesiliuoksena ja sen annetaan vaikuttaa 5–10 minuuttia (Luna 1968, 159; Cook 1974, 16; Luna 1992, 374–375; Prophet, Mills, Arrington & Sobin 1992, 151; Bancroft & Gamble 2002, 175; Kiernan 2008, 293). Perjodihappo hapettaa selektiivisesti kahteen vierekkäiseen hiiliatomiin kiinnittyneet hydroksyyliiryhmät eli glykolit kahdeksi aldehydiryhmäksi katkaisemalla hiilien välisen sidoksen (kuva 2). Perjodihappo hapettaa vain tietyt hiilihydraattirakenteet. Oksidaation seurauksena aldehydeja muodostuu vain glukoosiin, galaktoosiin, mannoosiin, fukooosiin ja joihinkin siaalihappoihin. PAS-värjäyksestä on kuitenkin modifikaatioita, joilla saadaan perjodihappo hapettamaan myös muita hiilihydraattien osia. (Bancroft & Gamble 2002 175; Kiernan 2008, 289–291; Kiernan 2010a, 82–83.)



KUVA 2. Glykolien hapettuminen aldehydeiksi perjodihapolla (Kiernan 2008, 289)

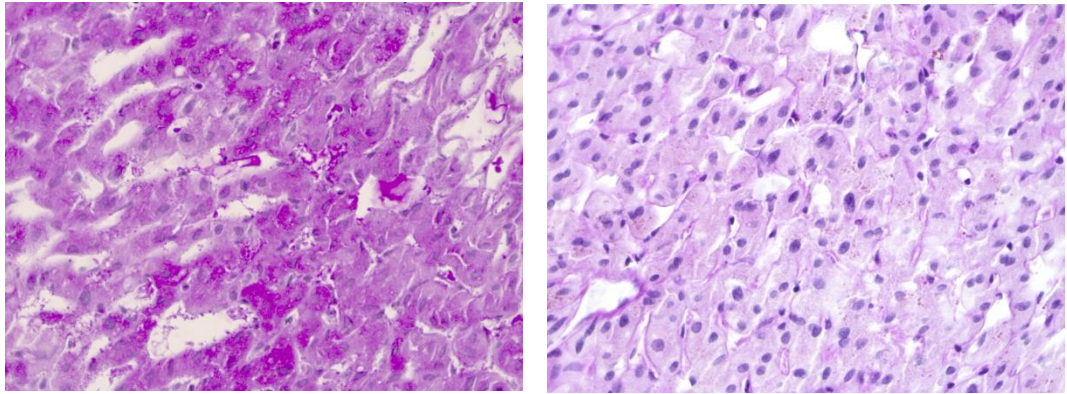
Schiffin reagenssi sisältää emäksistä fuksiinia, pararosaniiliinia ja rikkihapoketta. Pararosaniiliini ja rikkihapoke muodostavat värittömän värijohdannaisen, joka reagoi perjodihappoinkubaation seurauksena näytteeseen syntyneiden aldehydien kanssa ja sitoutuu niihin (kuva 3). Näiden reaktioiden seurauksena PAS-positiivisiin kudoserakenteisiin muodostuu purppuranpunainen väriyhdiste. (Bancroft & Gamble 2002 173–175; Kiernan 2008, 261–262; Kiernan 2010a, 83.)



KUVA 3. Schiffin reagenssin sitoutuminen kudoksen aldehydiin (Mukaiillen Kiernan 2010c, 169)

3.2 D-PAS-värjäys

Diastaasi-perjodihappo-Schiff- eli D-PAS-värjäyksessä näytteen glykogeeni pilkotaan diastaasientsyymien avulla pois. Tämän entsyymi-inkubaation eli diastaasikäsittelyn jälkeen näyte värjätään normaalilla PAS-värjäysohjelmalla. (Cook 1974, 153; Saxena 2010, 113.) Koska glykogeeni pilkotaan näytteestä pois, vain neutraalit limat värjäytyvät positiivisesti (Luna 1968, 171; Cook 1974, 153) (kuva 4). Esimerkiksi maksanäytteitä tutkittaessa näyteleikkeitä värjätään useimmiten sekä PAS- että D-PAS-värjäyksillä, jolloin kudoksen sisältämä glykogeeni ja neutraalit limat voidaan erottaa toisistaan (Saxena 2010, 113).



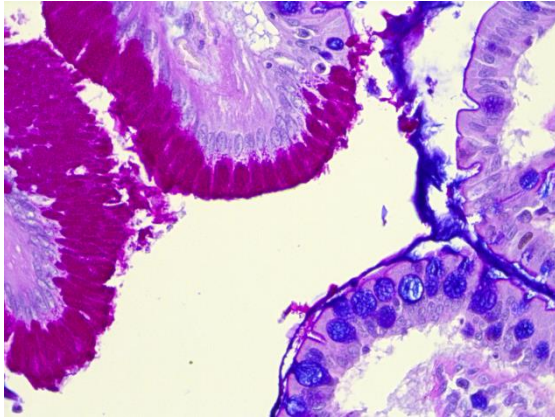
KUVA 4. Vasemmalla PAS-värjätty maksanäyte, jossa glykogeeni on värjäytynyt purpuranpunaiseksi. Oikealla D-PAS-värjättynä sama näyte, josta glykogeeni on pilkkoutunut diastaasilla.

Diastaasi sisältää sekä alfa- että beeta-amylaasia, jotka pilkkovat glykogeenin α -1:4-glykosididoksia. Pilkkoutumisen seurauksena vapautuneet glukoosi- ja maltoosimolekyylit ovat vesiliukoisia ja ne poistetaan näytteestä vesihuuhtelulla. Tätä seuraa varsinainen värjäysosuus. (Bancroft & Gamble 2002, 173.)

3.3 AB-PAS-värjäys

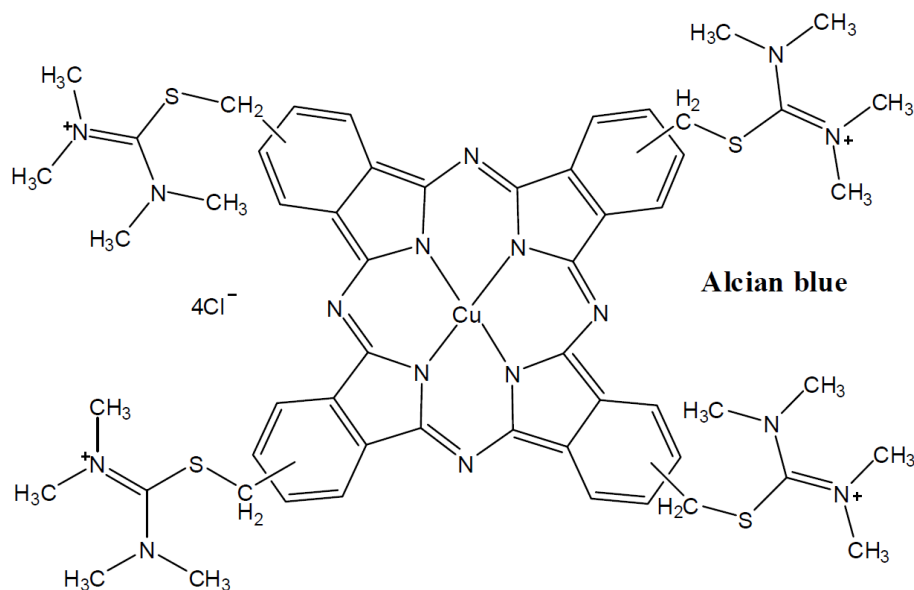
Alcian blue on yleisin happamien limojen osoittamiseen käytetty histologinen erikoisvärjäys. Sitä käytetään yleensä yhdessä PAS-värjäyksen kanssa (AB-PAS), jolloin happamat ja neutraalit limat voidaan erottaa toisistaan. (Bancroft & Gamble 2002, 178–179, 181; Kiernan 2008, 304; Myers 2009; Kiernan 2010a, 81.) AB-PAS-värjäystä käytetään yleisesti maha-suolikanavan näytteille (Naukkarinen 2000, 155).

AB-PAS-värjäyksessä näytettä inkuboidaan ensin Alcian bluesssa, jolloin happamat limat värjäytyvät sinisiksi. Tämän jälkeen värjäystä jatketaan PAS-värjäyksellä neutraalien limojen värjäämiseksi. Lopuksi tumat vastavärjätään hematoksyliinillä (kuva 5). (Horobin & Bancroft 1998, 10–11; Bancroft & Gamble 2002, 181–182; Kiernan 2008, 304–305; Myers 2009.)



KUVA 5. AB-PAS-värjätty duodenumin divertikkelinäyte, jossa happamat limat ovat värjäytyneet Alcian bluella sinisiksi ja neutraalit limat PAS-käsittelyllä purppuranpu-naisiksi.

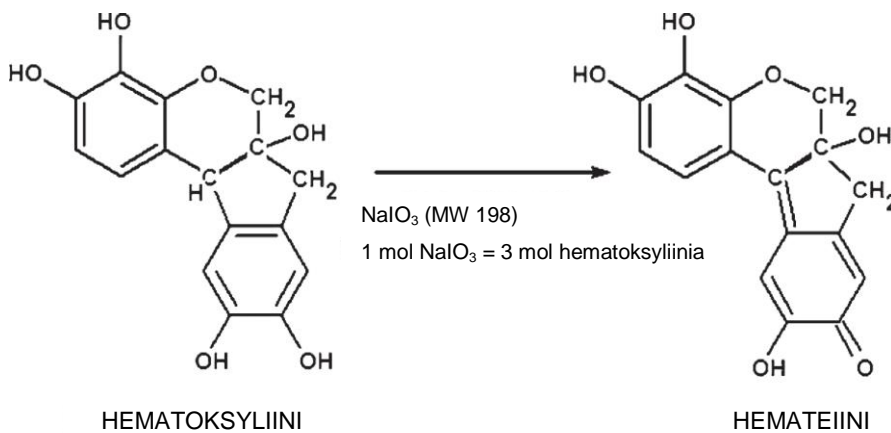
Alcian blue on suuri, hydrofiilinen ja kationinen värimolekyyli (kuva 6). Kationisena eli positiivisesti varautuneena molekyylinä Alcian blue tarttuu anionisiin eli negatiivisesti varautuneisiin kudusrakenteisiin. Se tarttuu pH:ssa 2,5 selektiivisesti vain happamien limojen karboksyyli- ja sulfaattiryhmiin, sillä suuren kokonsa vuoksi se ei pääse sitou-tumaan esimerkiksi nukleiinihappoihin. Yleisimmin käytetty Alcian bluen värjäysliuos on pH-arvoltaan 2,5, mutta siitä on olemassa myös happamampia ja emäksisempiä mo-difikaatioita. (Horobin & Bancroft 1998, 10; Bancroft & Gamble 2002, 178–179; Kier-nan 2008, 281; Myers 2009; Kiernan 2010a, 81.)



KUVA 6. Alcian Blue -molekyyli (Horobin 2010, 161)

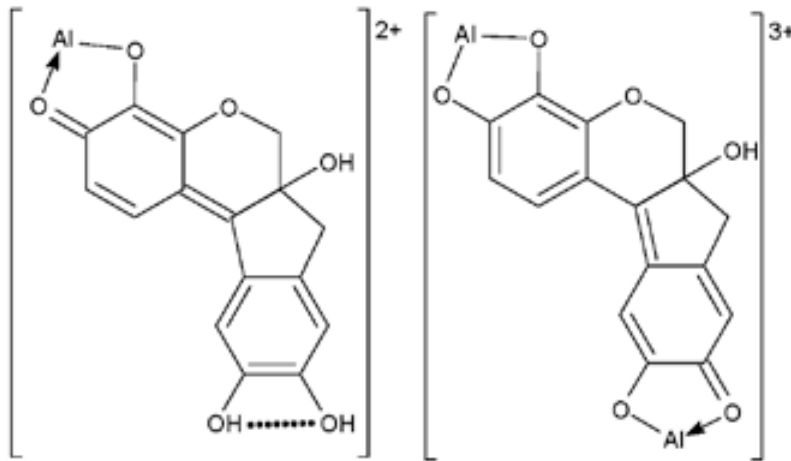
3.4 Tumaväri PAS-värjäyksissä

Hematoksyliini on yleisin tumien värjäämiseen käytetty väri patologiassa. Hematoksyliini on itsessään väritön yhdiste, mutta hapettuessaan se muuttuu värilliseksi hemateiiniksi (kuva 7). Hematoksyliini voidaan hapettaa luonnollisesti tai kemiallisesti ja näistä kemiallista hapettamista käytetään yleisemmin patologiassa. Hematoksyliinin kemialliseen hapettamiseen voidaan käyttää esimerkiksi natriumjodaattia tai kaliumpermanganaattia. (Bancroft & Gamble 2002, 125; Titford 2005, 73–75; Kiernan 2008, 146–147; Llewellyn 2009, 159; Kiernan 2010b, 29; Myers 2011.)



KUVA 7. Hematoksyliinin hapettuminen hemateiiniksi (Gill 2010, 12)

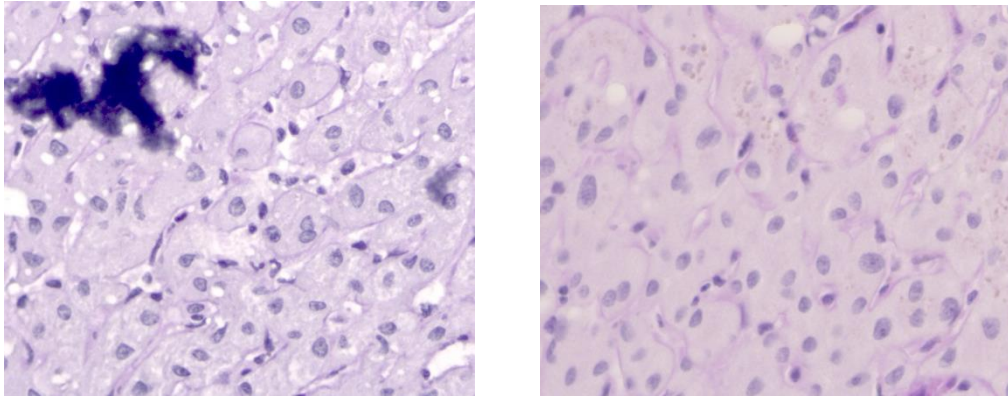
Hapetettu hematoksyliini yhdistetään mordanttiin, jolloin saadaan näytteen tumat värjättyä käytetystä värjäystekniikasta ja mordantista riippuen syvän sinisestä mustaan (kuva 8). Koska hemateinilla itsessään on alhainen affiniteetti kudoksen komponentteihin, siihen yhdistetään mordantti. Mordantin sitoutuminen hemateiniin saa aikaan positiivisen varauksen väri-mordanttikompleksiin, jolloin värin sitoutuminen tumaan kromatiiniin on mahdollista. Yleisimmin käytettyjä mordantteja ovat alunat eli alkalimetallien kaksois-sulfaatit, kuten kalium- tai ammoniumaluna. (Bancroft & Gamble 2002, 125–126; Titford 2005, 75–77; Llewellyn 2009, 159–164; Gill 2010, 120; Smith 2010, 43; Myers 2011.)



KUVA 8. Hemateiini-mordanttikompleksi, vasemmalla pH 2,6 ja oikealla pH 4,7 (Kiernan 2010b, 30)

Tumavärjäykseen käytettäviä hematoksyliiniliuoksia on useita erilaisia ja vaihtelua esiintyy värjäystekniikassa, käytetyssä mordantissa sekä väriliuoksen muissa komponenteissa ja niiden pitoisuuksissa (Dapson & Horobin 2009, 136; Dapson, Horobin & Kiernan 2009, 55; Llewellyn 2009, 159–160). Opinnäytetyön aiheena olleissa optimoitavissa PAS-värjäyksissä käytettiin Vaasan keskussairaalan patologian osastolla aiemmin Weigertin hematoksyliinia, jonka tilalla optimoitaessa värjäyksiä testattiin Mayerin hematoksyliinia.

Weigertin hematoksyliini on rautahematoksyliini, jossa rauta(III)kloridi toimii sekä hapettajana että mordanttina. Weigertin hematoksyliinilla värjätessä käytetään progressiivista värjäystekniikkaa, jonka tuloksena tumat värjäytyvät sinimustiksi. (Lillie & Pizzolato 1972, 116–117; Bancroft & Gamble 2002, 131; Titford 2005, 77.) Mayerin hematoksyliini puolestaan on alunahematoksyliini, jossa mordanttina toimii kalium- tai ammoniumaluna ja hapettajana natriumjodaatti. Mayerin hematoksyliinia käytettäessä värjäys voi olla joko progressiivinen tai regressiivinen. Tummat värjäytyvät aluksi punaisiksi, mutta väri muuttuu sinimustaksi vesijohtovesihuuhtelussa veden heikon emäksisyyden ansiosta (kuva 9). (Bancroft & Gamble 2002, 126–127.) Vaasan keskussairaalan patologian osastolla Weigertin hematoksyliini tehdään itse, kun taas optimoinnissa käytettävä Mayerin hematoksyliini on valmis kaupallinen väriliuos.



KUVA 9. Vasemmalla D-PAS-värjätty maksanäyte, jossa käytetty Weigertin hematoksyliinia ja oikealla vastaava, jossa käytetty Mayerin hematoksyliinia. Huomaa värisakka vasemmanpuoleisessa kuvassa.

3.5 Värjäysautomaatti Tissue-Tek® DRS 2000

Erikoisvärjykset voidaan tehdä käsin tai värjäysautomaatilla riippuen näytemäärästä ja käytettävissä olevista resursseista. Jos näytemäärä on suuri, on värjäysautomaatilla värjääminen nopeampaa ja vähemmän virheeltistä kuin käsin värjääminen. Tietokoneohjattun värjäysautomaatin käyttö mahdollistaa useiden värjäyssarjojen samanaikaisen värjäämisen siten, että värjykset valmistuvat mahdollisimman nopeasti. (Kumar & Gill 2010, 5.)

Vaasan keskussairaalan patologian osastolla on käytössä Sakura Tissue-Tek® DRS 2000 -värjäysautomaatti, jolla tehdään HE-, PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjykset. Tissue-Tek® DRS 2000 on tietokoneohjattu laite, johon voidaan ohjelmoida useita erilaisia värjäysohjelmia. Laitetta voidaan käyttää jatkuvan syötön tilassa, jossa laitteeseen on mahdollista syöttää uusi värjäyserä edellisten ollessa vielä värjäyksessä. Värjäysautomaatti ohjelmoi itse värjäysten suoritusjärjestyksen siten, että ne valmistuvat mahdollisimman nopeasti eikä päällekkäisyyksiä eri värjäyserien kesken pääse syntymään. (Operating Manual 2010, 1.1.)

4 ARTEFAKTAT HISTOLOGISISSA NÄYTTEISSÄ

Histologisia näytteitä valmistettaessa ei voida välttää kudokseen näytteen prosessoinnista aiheutuvia muutoksia eli artefaktoja (Wallington 1979, 3; Bancroft & Gamble 2002, 85). Artefaktat voidaan määritellä keinotekoisiksi, kudokseen kuulumattomiksi osiksi, jotka ovat syntyneet näytteen käsittelyn aikana. Useimpien artefaktojen syyt tunnetaan, mutta on myös syntyperältään epäselviä artefaktoja, jotka voivat aiheuttaa ongelmia näytteitä mikroskopoidessa. (Wallington 1979, 3.)

Moni asia näytteiden käsittelyssä ja prosessoinnissa vaikuttaa näytteiden värjäytyvyyteen ja laatuun, pelkkä onnistunut värjäys ei takaa hyvää värjäystulosta. Näytteet on otettava ja kuljetettava oikein, niiden fiksaatio on oltava oikeanlainen ja näytteiden valmistamisessa on noudatettava ohjeistuksia. Näytteitä prosessoitaessa on pyrittävä pitämään artefaktat samanlaisina kerrasta toiseen ja mahdollisuuksien mukaan ehkäisemään uusien syntymistä. (Wallington 1979, 3; Bancroft & Gamble 2002, 85.)

Tähän kappaleeseen on koottu kirjallisuudesta katsaus histologisissa näytteissä mahdollisesti esiintyvistä artefaktoista. Kirjallisuus jaottelee artefaktat hiukan eri tavoin, mutta suurimaksi osaksi jaottelu perustuu siihen, missä vaiheessa kudosprosessointia artefakta syntyy. Tähän työhön artefaktat on jaoteltu näytteenotossa, käsittelyssä ja fiksaatiossa syntyviin artefaktoihin, fiksaation aikana syntyviin artefaktoihin, dissektion, kudokuljetuksen ja valamisen aikana syntyviin artefaktoihin, leikkaamisessa ja leikkeen kiinnittämisessä syntyviin artefaktoihin, värjäyksissä syntyviin artefaktoihin sekä päällystämässä ja varastoinnissa syntyviin artefaktoihin.

4.1 Näytteenotossa, näytteen käsittelyssä ja fiksaatiossa syntyvät artefaktat

Kudokset voivat vaurioitua monin eri tavoin, kun niitä otetaan näytteiksi elimistöstä (Wallington 1979, 3). Näytteeksi otettava kudokse on irrotettava ja sitä on käsiteltävä hellävaraisesti siten, ettei siihen synny mekaanisia vaurioita (Rolls 2008). Tällaisia mekaanisia vaurioita kudoksille aiheuttavat kudoksen venyminen, repeytyminen, puristuminen ja murskaantuminen. Nämä näkyvät mikroskopoidessa erilaisina muutoksina tai vääristyminä kudosten rakenteissa. (Wallington 1979, 3; Rolls 2008.)

Jos kudosta poistetaan leikkauksen yhteydessä, on mahdollista, että näytteessä on mukana leikkausperäisiä artefaktoja, kuten ompeleita tai sideharsoa. Polttamalla poistetussa kudoksessa näkyy kuumudesta johtuvaa artefaktaa poistopinnalla. Aiemmista leikkauksista johtuen voi kudoksissa olla poikkeamia, kuten ruuvin reikä luussa. (Thompson & Luna 1978, 8; Wallington 1979, 4–6; Rolls 2008.) Näytteenoton aikana on myös mahdollista, vaikkakin epätodennäköistä, että näyte kontaminoituu. Mahdollisia kontaminantteja ovat esimerkiksi mikro-organismit, siitepöly, kangas- ja sideharsokuidut tai muut kudokseen kosketuksessa olleesta materiaalista peräisin olevat palat. (Wallington 1979, 8–10.)

Kudoksen kuivuminen voi johtaa artefaktojen syntyyn ja tämän vuoksi näyte on siirrettävä välittömästi irrottamisen jälkeen fiksatiiviin. (Thompson & Luna 1978, 4–6; Wallington 1979, 6; Rolls 2008.) Myös kontaminaatio desinfektioaineella voi aiheuttaa kuivumisartefaktaa. (Thompson & Luna 1978, 6.) Jos kudospala siirretään kuivaan näyteastiaan eikä fiksatiivia lisätä välittömästi, kudoksen alapinta pääsee painautumaan astian pohjaa vasten. Painautuminen aiheuttaa kudusrakenteen vääristymää ja estää fiksatiivin pääsyn kudoksenäytteen alapinnalle. (Wallington 1979, 6; Rolls 2008.)

Fiksaation aikana syntyviin artefaktoihin johtavat virheet ovat seurausta näytteenottajan tai näytettä histologian laboratoriossa käsittelevän laboratoriohoitajan virheellisestä työskentelystä (Thompson & Luna 1978, 22). Välitön fiksaatio estää kudoksen autolyysistä eli kudoksen hajoamisesta johtuvat artefaktat. Tämä ei kuitenkaan yksistään riitä, vaan fiksaation tulee olla myös riittävä eli ajallisesti tarpeeksi pitkä ja fiksatiivia tulee olla sopiva määrä kudoksen kokoon nähden. Myös näyteastian tulee olla tarkoitukseen sopiva, jotta kudos mahtuu näytekuppiin puristumatta. Näin kudoksen oikea muoto säilyy ja koko kudospala fiksoituu kauttaaltaan. (Wallington 1979, 15; Rolls 2008.)

Välittömällä ja riittävällä fiksaatiolla voidaan estää autolyysi, joka muutoin muuttaisi kudoksen rakennetta, morfologiaa ja värjäytyvyyttä. Autolyysin nopeus on kudospalasta; toisissa kudoksissa muutokset alkavat nopeammin kuin toisissa. Esimerkiksi mahan limakalvossa autolyysi alkaa melko nopeasti ja aiheuttaa muun muassa glykogeenin nopean katoamisen. (Wallington 1979, 13.) Riittämätön fiksaatio voi aiheutua liian pienestä fiksatiivin määrästä kudospalaan nähden, liian lyhyestä fiksointiajasta tai siitä, ettei fiksatiivi ole päässyt kaikkialle kudokseen. Suurten näytteiden fiksoitumista voidaan edesauttaa tekemällä näytteeseen viiltoja, jolloin näytteen formaliiniin kosketuk-

sessä oleva pinta-ala kasvaa ja fiksointi nopeutuu. (Thompson & Luna 1978, 24–28; Wallington 1979, 15–16; Rolls 2008.)

Fiksatiiveja on erilaisia ja käytettävän fiksiivin ominaisuudet, kuten pH tai puskurointi, vaikuttavat kudoksen morfologiaan. Esimerkiksi neutraali puskuroitu 10 % formaliini voi aiheuttaa kudoksessa olevan glykokeenin pakkautumisen solujen yhdelle laidalle, kun taas muunlaista fiksiivia käytettäessä tällaista glykokeenin vaeltamista ei tapahdu (Thompson & Luna 1978, 32–36, 48; Wallington 1979, 23.)

4.2 Dissektion, kuduskuljetuksen ja valamisen aikana syntyvät artefaktat

Dissekoitaessa näytteistä on tehtävä tasapaksuisia ja riittävän ohuita paloja varsinkin, jos kyseessä on tiheä kudos. Dissekoinnin aikana kudoksia on käsiteltävä hellävaraisesti, jotta näytteisiin ei syntyisi mekaanisia vaurioita. Tähän on kiinnitettävä erityistä huomiota, mikäli kudos on haurasta tai osittain fiksoitumatonta. (Rolls 2008.) Kudospalan on mahduttava käytettävään näytekasettiin puristumatta, sillä puristuminen aiheuttaa kudokseen rakenteeseen vääristymää (Bancroft & Gamble 2002, 85–86; Rolls 2008).

Kasetoitaessa pieniä biopsioita näytteet asetetaan kasettiin usein kahden ohuen vaahtomuovisen biopsiatyynyn välissä, jotta ne pysyvät kasetissa kuduskuljetuksen ajan. Kun kasetti suljetaan, vaahtomuovi painautuu näytteeseen. Jos näyte on tuore tai vain osittain fiksoitunut, voi näytteen pintaan syntyä pysyvä kuvio vaahtomuovista. (Rolls 2008; Rolls, Farmer & Hall 2012, 17.)

Parafiiniin valetuissa näytteissä esiintyy jonkinasteista kudoksen kutistumista ja kudusrakenteiden vääristymistä. Kuduskuljetusohjelman on oltava sellainen, että se sopii useille eri kudoksille ja ohjelman on oltava kerrasta toiseen samanlainen, jotta eri aikoina valmistettuja näytteitä voidaan verrata keskenään. Epäsopiva kuduskuljetusohjelma voi johtaa merkittäviin kudusrakenteen vaurioihin, kuten kudoksen halkeiluun tai reikiin kudoksissa. (Thompson & Luna 1978, 78–80; Wallington 1979, 31–32.)

Kuduskuljetuksen aikana kontaminaatio mikro-organismeilla on epätodennäköistä, mutta kontaminaatiota toisella kudoksella saattaa tapahtua. Tämän välttämiseksi pienet tai

helposti hajoavat näytteet tulee kasetoida pienessä pussissa tai biopsiatyyntyjen välissä. (Wallington 1979, 34–35.)

Suurin osa valamisen aikana tapahtuvista virheistä johtuu puutteellisesta valamistekniikasta. Koska parafiinin tehtävänä on tukea näytettä leikkaamisen aikana, johtaa huonosti valettu näyte leikkaamisen aikana syntyviin artefaktoihin. Valamisessa tapahtuvia virheitä ovat muun muassa kudoksen väärä suuntaaminen, näytteen liian pitkä altistaminen sulalle parafiinille, liian kuumen parafiinin käyttö tai eri kudoslautujen valaminen samaan blokkiin. Valamisesta johtuvia, leikatessa esiin tulevia artefaktoja ovat esimerkiksi leikkeen ylenmääräinen rypistyminen ja värinäjälkien syntyminen leikkeeseen, mikä näkyy leikkeessä ohuiden ja paksujen kohtien vuorotteluna. (Thompson & Luna 1978, 86–88; Wallington 1979, 39; Rolls 2008).

4.3 Leikkaamisessa ja leikkeen kiinnittämisessä syntyvät artefaktat

Laadukkaiden ja mahdollisimman vähän artefaktoja sisältävien leikkeiden valmistaminen vaatii hyvin valetun näytteen, sopivan mikrotomin, terävän veitsen ja osaavan leikkaajan. Mikrotomin veitsen ja näyteblokin tulee olla kiinnitetty mikrotomiin tukevasti ja veitsen kulman on oltava oikea näytteeseen nähden. Optimaalisella leikkuukulmalla voidaan vähentää leikkaamisesta väistämättä aiheutuvaa kudoksen puristumista ja muodon muuttumista. (Thompson & Luna 1978, 91; Wallington 1979, 37, 39, 41; Scouten 2010.)

Jos veitsi tai näyteblokki on löysästi kiinnitetty, leikkeeseen syntyy värinän jälkiä. Leikkeen repeämistä tai viirujen syntymistä aiheuttaa vahingoittunut veitsenterä, johon on kiinnittynyt ylimääräistä materiaalia tai johon on syntynyt lovi. Tylsän veitsen käyttö puolestaan aiheuttaa kudusrakenteen vääristymää. Parafiiniblokkia trimmatessa on oltava varovainen, ettei siitä irtoa paloja. (Thompson & Luna 1978, 92–100; Wallington 1979, 38; Rolls ym. 2012, 32–35.)

Ennen leikkeen kiinnittämistä lasille leikkeestä poistetaan rypyt mekaanisesti pensseleillä ja lämpimän veden avulla. Leikettä suoristettaessa on varottava, ettei leike repeydy eikä siihen synny reikiä. Liian kuuma vesi voi aiheuttaa kudoksen laajenemista tai kudusrakenteiden irtoamista toisistaan. (Wallington 1979, 42–43; Rolls 2008.)

Näyte voi kontaminoitua vedessä suoristamisen ja lasille siirtämisen aikana. Kontaminantteja voi olla esimerkiksi mikro-organismit, hilse, lika, selluloosakuidut tai muiden näytteiden palat. Kontaminaation välttämiseksi oikaisemiseen käytettävän veden tulee olla puhdasta ja se on vaihdettava riittävän usein. (Wallington 1979, 44–45; Rolls 2008; Rolls ym. 2012, 40.)

Vedessä olevan leikkeen alle saattaa jäädä ilmakuplia, jotka hajoavat kuivattamisen aikana ja voivat aiheuttaa repeämiä tai rypyjä näytteeseen. Näyte ei myöskään kiinnity ilmakuplan kohdalta kunnolla lasille. Kun leike on siirretty vedestä lasille, tulee siitä valuttaa ylimääräinen vesi ennen kiinnittämistä. Jos näin ei toimita, voi näytteeseen syntyä alueita, jotka ovat eri tasossa muuhun leikkeeseen nähden ja tämä vaikeuttaa mikroskopiointia. Kiinnityslämpötilan on oltava sopiva, koska se voi vaikuttaa kudoksen värjäytymiseen. (Thompson & Luna 1978, 116–118; Wallington 1979, 46; Rolls 2008; Rolls ym. 2012, 38.)

4.4 Värjäyksissä syntyvät artefaktat

Kirjallisuuden mukaan useimmat epäonnistuneet värjäysreaktiot johtuvat näytteen aiemmasta prosessoinnista. Itse värjäyksistä johtuvia artefaktoja on hyvin vähän, lähinnä epätäydellistä tai laikukasta värjäytymistä sekä värjäysliuoksista peräisin olevaa sakkaa tai kontaminaatiota. Värjäyksiä tehdessä on tärkeää noudattaa värjäysohjetta ja inkubatioaikoja, käyttää tarvittaessa kontrolleja laaduntarkkailuun ja värjätä näytteitä vakioiduissa oloissa. (Thompson & Luna 1978, 120; Wallington 1979, 48–49; Rolls 2008.) Vaasan keskussairaalan patologian osastolla PAS-värjäyksissä esiintyneet artefaktat syntyvät värjäysten aikana, sillä kudosprosessointi toimii moitteettomasti.

Ennen värjäämisen aloittamista näytteestä on poistettava kaikki parafiini. Jos näytteeseen on jäänyt parafiinia, nämä parafiinia sisältävät alueet värjäytyvät heikosti tai eivät ollenkaan. (Thompson & Luna 1978, 126; Wallington 1979, 48; Rolls 2008; Rolls ym.

2012, 46.) Myös leikkeen paksuus vaikuttaa värjäystulokseen. Yleisesti käytetään 3–6 µm:n paksuisia leikkeitä, mutta jotkin värjäykset vaativat tätä ohuemman tai paksumman leikkeen. (Wallington 1979, 48.)

Värjäysartefaktan syynä voi olla käytetty värjäysliuos. Vanhentunut värjäysliuos voi aiheuttaa negatiivisen värjäystuloksen tai sellaisten kudskomponenttien värjäytymisen, joita kyseisen värin ei tulisi värjätä. Värjäysliuoksessa oleva värisaostuma, liukenematon väri tai muu kiinteä aines voivat näkyä näytelasilla värisakkana. Sakan muodostumista voidaan välttää suodattamalla väriliuokset ja käyttämällä kannellisia värjäysastioita. (Wallington 1979, 48–49; Rolls ym. 2012, 49.)

PAS-värjäykseen käytettävän Schiffin reagenssin tulee olla väritöntä tai vaaleankellertävää (Luna 1992, 374; Horobin & Bancroft 1998, 156; Naukkarinen 2000, 155). Schiffin reagenssin keltaruskea väri viittaa akridiinikontaminaatioon ja vaalean aniliininpunainen väri vanhentuneeseen liuokseen. Tällaisia liuoksia ei tule käyttää, sillä ne voivat aiheuttaa normaalista poikkeavia värjäystuloksia. (Cook 1974, 17; Horobin & Bancroft 1998, 156.)

Jos PAS-värjäys on odottamattoman heikko, voi syynä olla esimerkiksi vesiliukoisten polysakkaridien liukeneminen näytteestä vesipohjaisiin reagensseihin. Tällaisissa tilanteissa voidaan vesipohjaiset reagenssit korvata vastaavilla alkoholipohjaisilla liuoksilla, pidentää oksidaatioaikaa tai lisätä perjodihappoon magnesiumkloridia. (Horobin & Bancroft 1998, 157–158.) Vaaleanpunaisen taustavärin syynä voi olla vanhentunut Schiffin reagenssi, perjodihapon siirtyminen Schiffin reagenssiin tai eri syistä kudokseen syntyneet tai jääneet, sinne normaalisti kuulumattomat aldehydit, samoin kuin endogeeniset aldehydit (Horobin & Bancroft 1998, 157–158; Kiernan 2008, 294). Erilaiset suolat Schiffin reagenssissa sekä runsaasti kysteiiniä sisältävät kudokset voivat aiheuttaa tiettyjen, ei-tarkoituksenmukaisten kudusrakenteiden purppuran väristä tai punaista värjäytymistä. (Horobin & Bancroft 1998, 157–158.)

Jos AB-PAS-värjäyksessä Alcian bluella värjäytyvät kudokset värjäytyvät heikosti, voi syynä olla liian lyhyt rehydraatioaika. Jotkin Alcian bluella värjäytyvät komponentit rehydroituvat hitaasti ja pidentämällä rehydraatioaikaa voidaan näiden osien värjäytyvyyttä parantaa. Voimakkaan Alcian bluen aiheuttaman taustavärjäytymisen syynä voi puolestaan olla väriliuoksessa oleva suola tai dekstriiniepäpuhtaudet. Liian pitkä inkui-

baatioaika Alcian bluessa voi johtaa sellaisten kudskomponenttien värjäytymiseen, joiden ei kuuluisi Alcian bluella värjäytyä. (Horobin & Bancroft 1998, 12.)

4.5 Päälystämässä ja varastoinnissa syntyvät artefaktat

Päälystäminen voi aiheuttaa artefaktoja, jotka voivat huonontaa näytteen laatua ja muuttaa värjäystulosta. Jos dehydraatio on ollut riittämätön, leikkeeseen jää vettä, joka näkyy läpinäkymättöminä alueina leikkeessä ja mikroskopoidessa vesipisaroina. Peitinlasiin alle saattaa jäädä vettä lisäksi myös ilmakuplia. (Thompson & Luna 1978, 168; Wallington 1979, 49–50; Rolls 2008; Rolls ym. 2012, 54–55.)

Käytettävän päälystysaineen tulee olla korkealaatuista, jottei se näytteen säilytyksen aikana kiteydy (Thompson & Luna 1978, 170; Rolls 2008). Päälystysaineet säilyttävät leikkeen värit hyvin, mutta altistuminen voimakkaalle valolle haalistaa värejä (Wallington 1979, 51; Rolls ym. 2012, 57).

5 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA ONGELMAT

Vaasan keskussairaalan patologian osasto halusi opinnäytetyön tehtäväksi, koska ulkoisilla laadunarviointikierroksilla PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäyksissä on esiintynyt värjäystulosta häiritsevää sakkua, liiallista taustaväriä ja lievää yli- tai alivärjäytymistä. Opinnäytetyön tarkoituksena on optimoida PAS-, D-PAS- AB-PAS-värjäykset Tissue-Tek® DRS 2000 -värjäysautomaatille. Tavoitteena on Vaasan Keskussairaalan patologian osaston histologisten leikkeiden PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäysten värjäystulosten laadun parantaminen.

Opinnäytetyön ongelmat olivat seuraavat:

1. Miten hematoksyliinin vaihtaminen toiseen vaikuttaa värjäystulokseen?
2. Miten inkubaatioaikojen muuttaminen vaikuttaa värjäystulokseen?
3. Miten värjäysliuosten koostumuksen muuttaminen vaikuttaa värjäystulokseen?

6 OPINNÄYTETYÖN MENETELMÄ JA AINEISTO

6.1 Menetelmä

Tämä opinnäytetyö on luonteeltaan kokeellinen eli eksperimentaalinen tutkimus, jossa tutkitaan asioiden suhteita toisiinsa. Hirsjärven, Remeksen ja Sajavaaran (1997) mukaan kokeellisessa tutkimuksessa näytteet valitaan tarkoituksenmukaisesti ja niitä analysoidaan erilaisissa vakioituissa koeolosuhteissa (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 1997, 134). Tässä opinnäytetyössä käytetään potilas- ja obduktionäytteitä värjäyksiä optimoitaessa. Näytteet valittiin siten, että ne sisältävät juuri sitä materiaalia, jota optimoitavilla värjäyksillä on tarkoitus osoittaa. Näytteiksi kerättiin useita eri potilasnäytteitä, jolloin voitiin osoittaa värjäyksen toimivuus eri näytetyypeillä ja kudoksilla. Näytelasien testivärjäykset tapahtuvat vakioituissa koeolosuhteissa etukäteen laaditun testisuunnitelman mukaisesti.

Eksperimentaalisisessa tutkimuksessa suunnitellaan, miten haluttu muutos saadaan aikaan tutkittavassa ilmiössä. (Hirsjärvi ym. 1997, 134.) Tuomen (2007) mukaan kokeellisessa tutkimuksessa tutkitaan ilmiössä olevien muuttujien syy-seuraussuhteita (Tuomi 2007, 102–103). Tämän opinnäytetyö jokaisessa testissä muutetaan yhtä tai muutamaa muuttujaa, kuten inkubaatioaikaa tai liuoksen koostumusta, ja jokaisen testin jälkeen arvioidaan, millainen vaikutus muutoksilla on värjäystulokseen. Jatkotestit suunnitellaan tutkimuksen edetessä saatujen tulosten pohjalta.

Eksperimentaalisisessa tutkimuksessa koeasetelmaan kuuluu sekä koe- että kontrolliryhmä. Koeryhmä altistetaan yhdelle tai useammalle koetilanteelle, minkä jälkeen tuloksia verrataan kontrolliryhmän tuloksiin. (Tuomi 2007, 102–103.) Opinnäytetyön koeasetelman koeryhmänä toimivat valituista näytteistä leikatut leikkeet, jotka värjätään värjäysten erilaisilla muunnoksilla. Kontrolliryhmän muodostavat leikkeet, jotka värjätään testaushetkellä käytössä olevilla värjäysohjelmilla. Koe- ja kontrolliryhmän leikkeet leikattiin samoista näytteistä, minkä ansiosta värjäystuloksia voidaan luotettavasti verrata keskenään.

6.2 Optimoinnissa käytettävät näytteet

Sairaalasolubiologi Pirkko Heino valitsi työssä käytettävät näytteet. Näytteiden valinta perustui siihen, että ne sisältävät PAS-värjäyksillä värjäytyvää materiaalia, näytteitä on luotettavan tuloksen saamiseksi riittävä määrä ja ne edustavat eri kudoksia. Tutkimusta varten opinnäytetyön tekijät etsivät valitut näytteet arkistosta ja leikkasivat niistä tarvittavan määrän leikkeitä.

Sairaalasolubiologi suunnitteli myös, mitä näytteitä mihinkin testiin käytetään ja optimointia tehdessä toimittiin tämän mukaisesti. Näytelasit identifioitiin aluksi näyttenumerolla, värjäyksen nimellä ja leikenumeraalla. Näyttenumero on alkuperäisen potilasnäytteen tutkimusnumero. Näyteblokkeihin on merkattu juoksevan näyttenumeron lisäksi potilaan sukunimi, mutta sitä ei kirjattu laselle. Raportointia varten näytteet nimettiin uudelleen kirjaintunnuksin, jolloin potilaita ei voida tunnistaa tämän tutkimuksen yhteydessä. Tutkimuksen edetessä käytettäville laselle lisättiin testitiedot ja käytettävän värjäyksen nimi ennen kunkin värjäyksen aloittamista.

Testejä tehdessä näytelaseja käytettiin pääosin leikejärjestyksessä. Näin kuhunkin testiin voitiin käyttää peräkkäisiä, toisistaan mahdollisimman vähän poikkeavia näytteitä. Laselle merkittiin leikenumero, jotta tiedettiin, miltä syvyydeltä leike on näytteestä leikattu. Periaatteessa ennen testausta ei voitu olla varmoja siitä, sisältävätkö käytettävät näytteet värjäyttävää materiaalia koko näytteen syvyydeltä. Jos leikkeissä ei ole värjäyttävää materiaalia, saadaan odottamaton negatiivinen värjäystulos. Jos tällainen tilanne ilmenee tutkimuksessa, helpottaa leikenumero odottamattoman negatiivisen värjäystuloksen syyn selvittelyä.

Kunkin värjäyksen optimointiin valittiin omat näytteet. PAS-värjäyksen optimoinnissa käytettävät näytteet olivat ileum- eli sykkyräsuoliresekaatista otettu mahatyypistä solukkoa sisältävä näyte sekä obduktiossa otetut maksanäytteet. D-PAS-värjäyksessä käytettävät näytteet olivat maksabiopsioita sekä obduktiossa otettuja maksanäytteitä. AB-PAS-värjäyksessä käytettävät näytteet olivat ileumresekaatista otettu ohutsuolisolukkoa sisältävä näyte ja duodenumin divertikkeli eli pohjukaissuolen umpipussi (taulukko 1).

TAULUKKO 1. Värjäyksissä käytetyt näytteet ja näytteen laatu.

Värjäys	Näytteet	Näytemateriaali
PAS	näyte <i>a</i>	ileumresekaatti (maha)
	näyte <i>b</i>	maksa (obduktio)
	näyte <i>c</i>	
D-PAS	näyte <i>d</i>	maksabiopsiat
	näyte <i>e</i>	
	näyte <i>f</i>	
	näyte <i>g</i>	
	näyte <i>h</i>	
	näyte <i>i</i>	
	näyte <i>j</i>	maksa (obduktio)
	näyte <i>k</i>	
AB-PAS	näyte <i>l</i>	ileumresekaatti (suoli)
	näyte <i>m</i>	duodenumin divertikkeli

7 OPTIMOINNIN TOTEUTTAMINEN

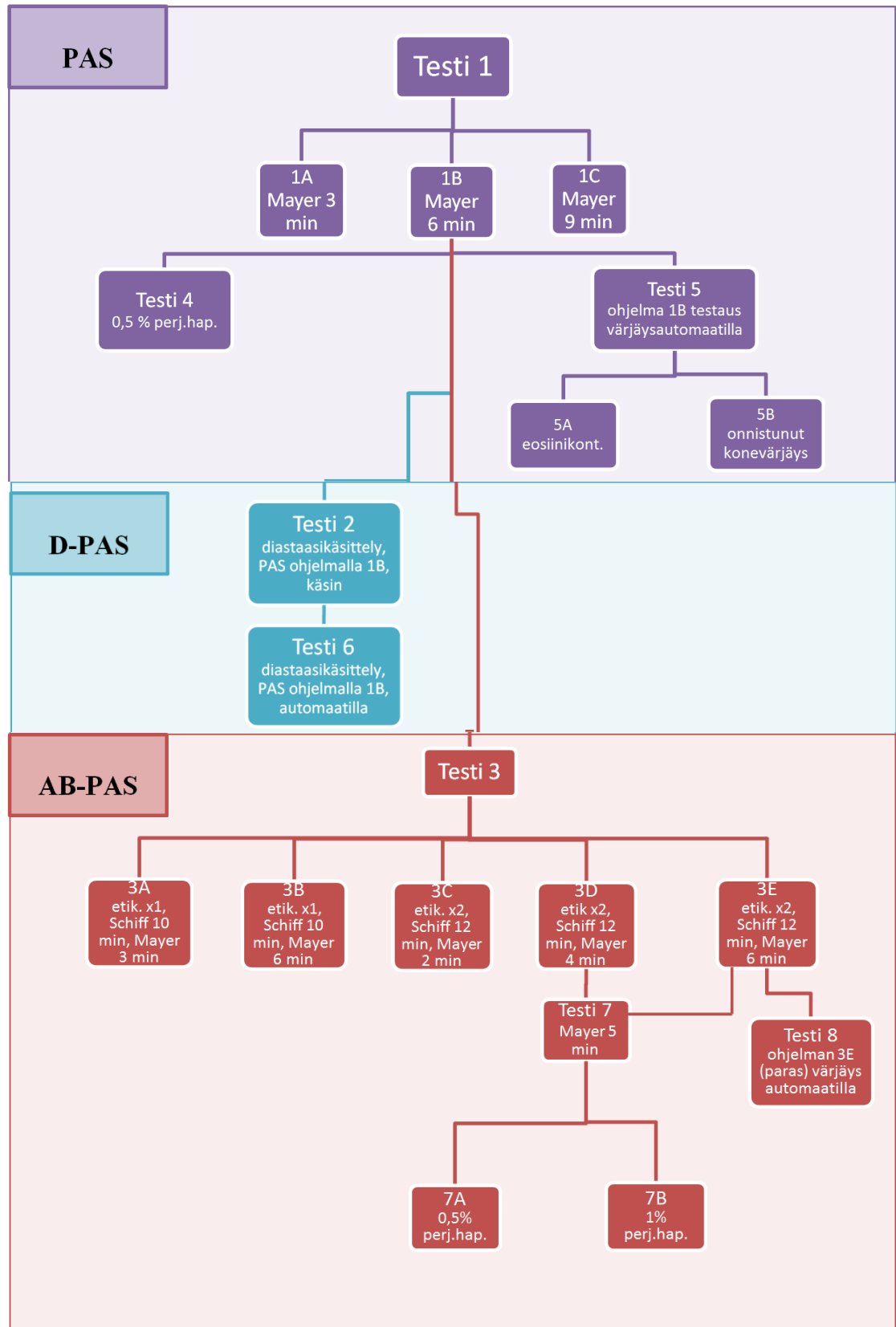
7.1 Alkuvalmistelut ennen optimointia

Opinnäytetyön aihe saatiin kesällä 2012 ja ensimmäinen palaveri opinnäytetyön toteuttamisesta pidettiin 31.8.2012 sairaalasolubiologi Pirkko Heinin ja osastonhoitaja Anu Rantalan kanssa Vaasan keskussairaalan patologian osastolla. Opinnäytetyön suunnitelma laadittiin syksyllä 2012 ja suunnitelma sekä luvat hyväksyttiin 15.1.2013. Opinnäytetyön lähdemateriaalin kerääminen aloitettiin marraskuussa 2012 ja teoriaosuuden kirjoittaminen tammikuussa 2013. Kirjoittamisprosessi jatkui syksyyn 2013 asti.

Käytännön osuuden suunnittelupalaveri pidettiin Vaasassa 28.3.2013 sairaalasolubiologin kanssa. Palaverissa sovittiin käytännön järjestelyistä ja opinnäytetyön tekijät tutustuivat optimoitavissa värjäyksissä esiintyviin artefaktioihin. Palaverin jälkeen leikattiin valmiiksi osa optimoinnissa käytettävistä näytteistä. Tutkimuksen kokeellinen osuus suoritettiin Vaasan keskussairaalan patologian osastolla ajalla 15.4.–19.4.2013. Tutkimuksen toteuttamiseen oli varattu alustavasti nämä viisi työpäivää ja lisäksi tutkimusta varauduttiin jatkamaan tarvittaessa myöhemmin. Ennen kokeellisen osuuden aloittamista sairaalasolubiologi Pirkko Heino suunnitteli ja lähetti sähköpostitse opinnäytetyön tekijöille testivärjäysohjelmat ja ohjeistuksia käytännön toteuttamiseen liittyen.

7.2 Optimointi

Kokeellinen osuus aloitettiin PAS-värjäyksen optimoinnilla, sillä kaksi muuta optimoitavaa värjäystä ovat tämän värjäyksen modifikaatioita. PAS-testauksessa parhaan tuloksen antanutta värjäysohjelmaa käytettiin jatkossa pohjana D-PAS- ja AB-PAS-värjäysten testauksessa. Käytännön osuus toteutettiin testivärjäysohjelmien ja sairaalasolubiologilta saatujen muiden ohjeistusten mukaisesti. Optimoinnin eteneminen on esitetty kuviossa 1.



KUVIO 1. Optimoinnin eteneminen.

Testivärjykset tehtiin käsin, koska värjäysautomaattiin ei ollut mahdollista lisätä testi-
värjäysohjelmissa tarvittavia liuoksia vapaiden liuosastioiden puutteen vuoksi. Käsivär-
jäyksissä parhaan tuloksen antaneet testivärjäysohjelmat testattiin lopuksi myös vär-
jäysautomaatilla.

Ennen varsinaista värjäämisen aloittamista valmistettiin tarvittavat liuokset. Ksyleeni,
absoluuttinen alkoholi sekä 96 % alkoholi olivat valmiita liuoksia. 80 % alkoholi val-
mistettiin 200 ml:sta absoluuttista alkoholia ja 50 ml:sta tislattua vettä. Värjäyksiä var-
ten valmistettiin myös 1 % perjodihappo punnitsemalla 2,5 g perjodihappoa ja liuotta-
malla se 250 ml:an tislattua vettä. Schiffin reagenssi ja Mayerin hematoksyliini olivat
valmiita kaupallisia liuoksia.

Käsivärjäys tapahtui siten, että näytelasit asetettiin värjäyskoriin ja korja siirrettiin käsin
liuosastiasta toiseen. Inkubaatioajat mitattiin digitaalisella sekuntikellolla (kuva 10).



KUVA 10. Käsivärjäyspaikka.

7.3 PAS-värjäyksen optimointi

Vaasan keskussairaalan patologian osastolla käytettiin ennen optimointia PAS-
värjäyksessä ohjelmaa, jossa inkubaatio 1 % perjodihapossa oli 10 minuuttia, kaupalli-
sessa Schiffin reagenssissa 10 minuuttia ja itse valmistetussa Weigertin hematoksylii-
nissä 8 minuuttia. Näitä tekijöitä muutettiin PAS-värjäyksen optimoinnissa ja lisäksi
muutoksia tehtiin värjäysohjelman dehydraatio- ja kirkastusaikoihin (liite 1).

Testin 1 tavoitteena oli hyvä PAS-värjäys ilman taustavärjäytymistä. PAS-värjäyksen
optimointiin käytettiin näytteitä *a*, *b* ja *c* (taulukko 1). Näyte *a* on mahatyypistä soluk-
koa sisältävä ileumresekaattinäyte ja näytteet *b* ja *c* ovat obduktiomaksanäytteitä. Tes-

tiin 1 sisältyi testivärjäysohjelmat 1A, 1B ja 1C (taulukko 2). Testissä 1A käytettiin 3 minuutin, Testissä 1B 6 minuutin ja testissä 1C 9 minuutin hematoksyliiniaikaa. Kaikissa testeissä perjodihapon inkubaatioaika oli 5 minuuttia ja Schiffin reagenssin 12 minuuttia (taulukko 2). Testin 1 0-näytteiksi värjättiin edellä mainituista näytteistä leikkeet numero 1. Testissä 1A käytettiin leikkeitä numero 2, Testissä 1B leikkeitä numero 3 ja Testissä 1C leikkeitä numero 4. Näistä kolmesta testistä paras värjäystulos saatiin Testillä 1B, minkä vuoksi Testi 1B toimi perustana jatkotesteille.

TAULUKKO 2. Testissä 1 muutetut liuokset ja inkubaatioajat.

Muuttujat	Vanha ohjelma (0-näyte)	1A	1B	1C
Perjodihappo 1 %	10 min	5 min	5 min	5 min
Juokseva vesi	2 min	3 min	3 min	3min
Schiffin reagenssi	10 min	12 min	12 min	12 min
Hematoksyliini	Weigert 8 min	Mayer 3 min	Mayer 6 min	Mayer 9 min
ksyleeni	2 min	5 min	5 min	5 min
ksyleeni	2 min	5 min	5 min	5 min

Testin 4 tarkoituksena oli kokeilla, voisiko 1 % perjodihapon korvata 0,5 % perjodihapolla. Testi 4 oli muilta osin kuten Testi 1B (liite 1). Testiä 4 varten valmistettiin 0,5 % perjodihappoliuos liuottamalla 1,25 g perjodihappoa 250 ml:an tislattua vettä. Testissä 4 käytettiin leikkeitä numero 5 ja se tehtiin käsivärjäyksenä.

Testissä 5 kokeiltiin, saadaanko käsivärjäyksessä hyväksi todetulla Testin 1B värjäysohjelmalla vastaava tulos värjäysautomaatilla (liite 1). Testissä 5A käytettiin leikkeitä numero 6 ja Testissä 5B leikkeitä numero 7. Testejä varten värjäysautomaattiin vaihdettiin Weigertin hematoksyliinin tilalle Mayerin hematoksyliini ja laitteeseen ohjelmoitiin uusi Testi 1B:n mukainen PAS-ohjelma, joka nimettiin *pas(mayer)*.

Testi 5B tehtiin kesällä 2013. Käytettävä värjäysohjelma oli sama kuin Testissä 5A. Konevärjäys toistettiin, koska Testissä 5A värjäystulos ei ollut odotetun kaltainen. Testi 5B tehtiin samaan aikaan kuin AB-PAS-optimoinnin Testi 8. Näitä testejä varten vär-

jäysautomaattiin vaihdettiin kaikki alkoholit, muuten värjäysliuoksina käytettiin laitteessa värjäyshetkellä olleita liuoksia.

Värjäysautomaattiin ei ollut mahdollista ohjelmoida Testi 1B:n kanssa täysin identtistä värjäysohjelmaa. Laitteessa ei ole nousevassa alkoholisarjassa lainkaan 80 % alkoholia, vaan sen tilalla on 96 % alkoholi. Käsivärjäyksessä näytteiden kirkastus tapahtui kahdessa ksyleenissä, joissa kummassakin näytettä inkuboidaan viisi minuuttia. Värjäysautomaatilla tämä ei ole mahdollista, sillä inkubaatioaika voidaan asettaa vain yhdelle kirkastusksyleenille. Laitteessa on tämän lisäksi kaksi muuta kirkastusksyleeniä, mutta ne ovat värjäyksen lopetusasemia, joille ei voida asettaa inkubaatioaikaa. Näistä eroavaisuuksista keskusteltiin sairaalalubiologin kanssa, jonka päätöksellä 80 % alkoholin tilalla käytetään 96 % alkoholia ja kahden ksyleenin sijaan näytteitä inkuboidaan ksyleenissä, jolle inkubaatioaika voidaan asettaa, viisi minuuttia.

7.3.1 D-PAS-värjäyksen optimointi

D-PAS-värjäyksissä näytteille tehtiin aina parafiinin poisto, rehydraatio ja diastaasikäsittely käsin riippumatta siitä, värjättiinkö näytteet loppuun käsin vai värjäysautomaatilla. Diastaasikäsittelyn jälkeen värjäys eteni kuten PAS-värjäys.

Testin 2 tarkoituksena oli varmistaa diastaasin toimivuus ja Mayerin hematoksyliinin soveltuvuus D-PAS-värjäykseen (liite 2). Testissä 2 käytettiin Testi 1B:n värjäysohjelmaa, johon lisättiin diastaasikäsittely. Testissä 2 käytettiin näytteitä *d*, *e*, *f*, *g*, *h* ja *i*, jotka ovat maksabiopsioita sekä näytteitä *j* ja *k*, jotka ovat obduktiomaksanäytteitä (taulukko 1).

Diastaasiliuos valmistettiin punnitsemalla 100 mg diastaasia ja 170 mg pankreatiinia, jotka liuotettiin 100 ml:an tislattua vettä. Liuosta sekoitettiin magneettisekoittajassa 37 minuuttia. Parafiinin poiston ja rehydraation jälkeen edellä mainituista näytteistä leikkeitä 1 ja 2 inkuboitettiin diastaasissa 30 minuutin ajan glykokeenin pilkkomiseksi.

Leikkeet numero 1 edellä mainituista näytteistä toimivat Testin 2 0-näytteinä. Diastaasikäsittelyn jälkeen ne värjättiin värjäysautomaatilla vanhalla D-PAS-ohjelmalla. Leikkeiden numero 2 PAS-osuus toteutettiin diastaasikäsittelyn jälkeen Testin 1B mukaisesti

käsin värjäämällä (liite 2). Leikkeitä numero 3 ei käsitelty diastaasilla, vaan ne värjättiin pelkällä 1B:n mukaisella PAS-ohjelmalla käsin, jotta diastaasin toimivuus voidaan todeta. Vanhalla PAS-ohjelmalla ei leikkeitä nyt värjäyty, koska näytteistä oli valmiina kyseisellä PAS-ohjelmalla värjäytyt näytelasit.

Testin 6 värjäysohjelma oli sama kuin Testissä 2, mutta diastaasikäsittelyn jälkeen värjäys tapahtui värjäysautomaatilla. Testiin 6 käytettiin edellä mainituista näytteistä leikkeet numero 4. Testin tarkoituksena oli osoittaa, että Testin 2 värjäysohjelma toimii värjäysautomaatilla (liite 2). Testiä 6 varten valmistettiin uusi diastaasiliuos samoin kuin aiemmin. Testiä varten värjäysautomaattiin vaihdettiin Mayerin hematoksyliini ja ohjelmoitiin uusi *d-pas(mayer)*-niminen värjäysohjelma. 80 % alkoholin ja kirkastusk-syleenien kanssa toimittiin kuten PAS-automaattivärjäyksen kohdalla.

7.3.2 AB-PAS-värjäyksen optimointi

AB-PAS-värjäyksen optimoinnin tarkoituksena oli löytää tasapaino Alcian bluen ja PAS:n välille siten, että ne erottuvat selkeästi toisistaan eikä kumpikaan peittäisi toistaan. Vaasan keskussairaalan patologian osastolla käytössä olleessa AB-PAS-värjäyksessä etikkahapon inkubaatioaika oli 3 minuuttia ennen 30 minuutin inkubaatiota Alcian blue -väriliuoksessa. Alcian bluen jälkeen näytteitä huuhdeltiin juoksevassa vedessä 10 minuuttia, inkuboitiin 1 % perjodihapossa 10 minuuttia ja huuhdeltiin juoksevalla vedellä 2 minuuttia. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin 10 minuuttia Schiffin reagenssissa, huuhdeltiin juoksevassa vedessä 10 minuuttia ja värjättiin Weigertin hematoksyliinillä 8 minuuttia (liite 3). Testissä 3 muutettiin näiden tekijöiden lisäksi kirkastusaikoja. Testeissä 3A ja 3B näytteitä inkuboitiin etikkahapossa 1 minuutti ennen Alcian blueta, kun taas Testeissä 3C, 3D ja 3E näytteitä inkuboitiin etikkahapossa 10 sekuntia ennen ja jälkeen Alcian bluen (taulukko 3).

Ennen AB-PAS-käsivärjäysten aloittamista vaihdettiin nousevan alkoholisarjan 80 %, ensimmäinen 96 % ja ensimmäinen absoluuttinen alkoholi. Lisäksi valmistettiin 3 % etikkahappoliuos lisäämällä 7,5 ml jääetikkaa 250 ml:an tislattua vettä. Alcian blue -liuos valmistettiin mittaamalla 250 ml 0,1 M vetykloridia (HCl), jonka pH säädettiin 2,56:een 20 % natriumhydroksidiliuoksella (NaOH). Alcian blueta punnittiin 2,5 g ja

tämä liuotettiin pH-säädettyyn vetykloridiliuokseen. Liuos jätettiin vetokaappiin yöksi ja seuraavana aamuna liuos suodatettiin. Suodattamisen jälkeen liuos oli käyttövalmista.

Muuttujat Ohjelmat	Ohjelma	Vanha ohjelma	3A	3B	3C	3D	3E
Etikkahappo	3 min	1 min	1 min	1 min	10 s	10 s	10 s
Alcian blue	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
Etikkahappo	-	-	-	-	10 s	10 s	10 s
Juokseva vesi	10 min	10 min	10 min	10 min	1 min	1 min	1 min
Perjodihappo 1 %	10 min	10 min	10 min	10 min	5 min	5 min	5 min
Juokseva vesi	2 min	2 min	2 min	2 min	1 min	1 min	1 min
Schiffin reagenssi	10 min	10 min	10 min	10 min	12 min	12 min	12 min
Hematoksyliini	Weigert 8 min	Mayer 3 min	Mayer 6 min	Mayer 2 min	Mayer 4 min	Mayer 6 min	Mayer
Ksyleeni	2 min	2 min	2 min	2 min	5 min	5 min	5 min
Ksyleeni	2 min	2 min	2 min	2 min	5 min	5 min	5 min

TAULUKKO 3. Testissä 3 muutetut liuokset ja inkubaatioajat.

Testissä 3 käytettiin näytteitä *l* ja *m* (taulukko 1). Näyte *l* on suolityyppistä solukkoa sisältävä ileumresekaattinäyte ja näyte *m* on duodenumin divertikkelinäyte. Leikkeet numero 1 toimivat 0-näytteinä eli ne värjättiin värjäysautomaatissa vanhalla AB-PAS-ohjelmalla. Testiin 3A käytettiin leikkeitä numero 2 ja 10, Testiin 3B leikkeitä numero 3 ja 11, Testiin 3C leikkeitä numero 4 ja 7, Testiin 3D leikkeitä numero 5 ja 8 ja Testiin 3E leikkeitä numero 6 ja 9. Leikkeet numero 12 värjättiin käsin Testin 1B mukaisella PAS-ohjelmalla verrokeiksi AB-PAS-värjätyille näytteille.

Testit 3A-3E tehtiin aluksi leikkeille numero 2-6, mutta nämä näytteet hylättiin käsivärjäyksessä tapahtuneiden virheiden vuoksi. Ensimmäisen AB-PAS-värjäysyrityksen Testin 3A leikkeiden (numero 2) inkubaatioaika kahdessa viimeisessä ksyleenissä oli 5+1 minuuttia, vaikka inkubaatioaika ohjeiden mukaan olisi ollut 2+2 minuuttia. Testin 3B leikkeitä (numero 3) inkuboitii vain toiseksi viimeisessä ksyleenissä 3 minuuttia. Puolestaan testien 3C, 3D ja 3E leikkeet (numerot 4-6) siirrettiin Alcian bluen jälkeisestä etikkahaposta ensin virheellisesti Schiffin reagenssiin, josta ne siirrettiin edelleen vir-

heellisesti perjodihappoon. Schiffin reagenssissa leikkeet olivat noin 10 sekuntia ja perjodihapossa muutamia sekunteja. Perjodihaposta leikkeet siirrettiin juoksevaan veteen, johon ne ohjeen mukaan olisi tullut toisen etikkahappokäsittelyn jälkeen siirtää. Värjäykset jatkettiin virheistä huolimatta loppuun, mutta värjäysprosessin virheiden vuoksi näytteet jätettiin tarkastelun ulkopuolelle, vaikka mikroskooppisesti tarkasteltuina näytelaseilla ei havaittu virheiden vaikutuksia. Testit toistettiin värjäysohjelmien mukaisesti luotettavien tulosten takaamiseksi leikkeillä numerot 7-11.

Testissä 7 kokeiltiin 0,5 % perjodihapon toimivuutta AB-PAS-värjäykseen, jossa ennen ja jälkeen Alcian blue -inkubaatiota näytteet käsiteltiin 10 sekuntia etikkahapossa (liite 4). Lisäksi Testillä 7 kokeiltiin 5 minuutin inkubaatioaika Mayerin hematoksyliinissä. Mikroskopoidessa testinäytteitä 3C, 3D ja 3E, olivat Testien 3D ja 3E värjäystulokset patologiien ja sairaalalubiologin mielestä parhaat. Testeissä 3C, 3D ja 3E näytelaseja inkuboitii etikkahapossa 10 sekuntia ennen ja jälkeen Alcian bluen. Hematoksyliinin inkubaatioaika näissä testeissä oli 2, 4 ja 6 minuuttia. Kahden minuutin ero Testien 3D ja 3E välillä hematoksyliinin inkubaatioajoissa vaikutti värjäystuloksiin melko vähän. Kuitenkin kuuden minuutin inkubaatioaika oli hiukan pidetympi. Tämän vuoksi Testiin 7 yhdistettiin perjodihapotestauksen lisäksi uusi viiden minuutin hematoksyliinin inkubaatioaika, sillä haluttiin kokeilla neljän ja kuuden minuutin väliltä olevan hematoksyliinin inkubaatioajan toimivuutta.

Testiin 7A käytettiin leikkeet numero 13 ja nämä käsiteltiin 0,5 % perjodihapolla. Testissä 7B leikkeet numero 14 käsiteltiin vertailun vuoksi 1 % perjodihapolla. Testit 7A ja 7B tehtiin käsivärjäyksenä.

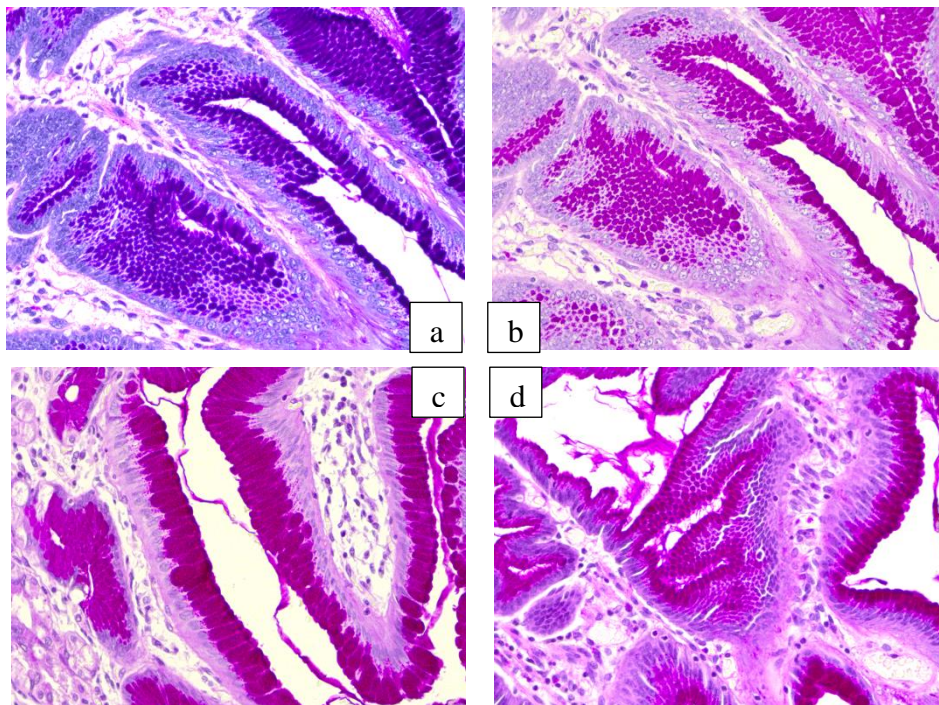
Testissä 8 kokeiltiin, saadaanko käsivärjäyksessä parhaaksi todetulla, Testi 3E:n mukaisella AB-PAS-värjäysohjelmalla käsivärjäystä vastaava värjäystulos värjäysautomaatilla (liite 3). Testiin 8 käytettiin leikkeitä numero 15. Testiä varten värjäysautomaattiin ohjelmoitiin Testi 3E:n mukainen värjäysohjelma, joka nimettiin *ab-pas(mayer)*. 80 % alkoholin ja toisen kirkastusksyleenin kohdalla tehtiin samanlaiset muutokset värjäysohjelmaan kuin PAS- ja D-PAS-värjäysohjelmissa.

8 TULOKSET

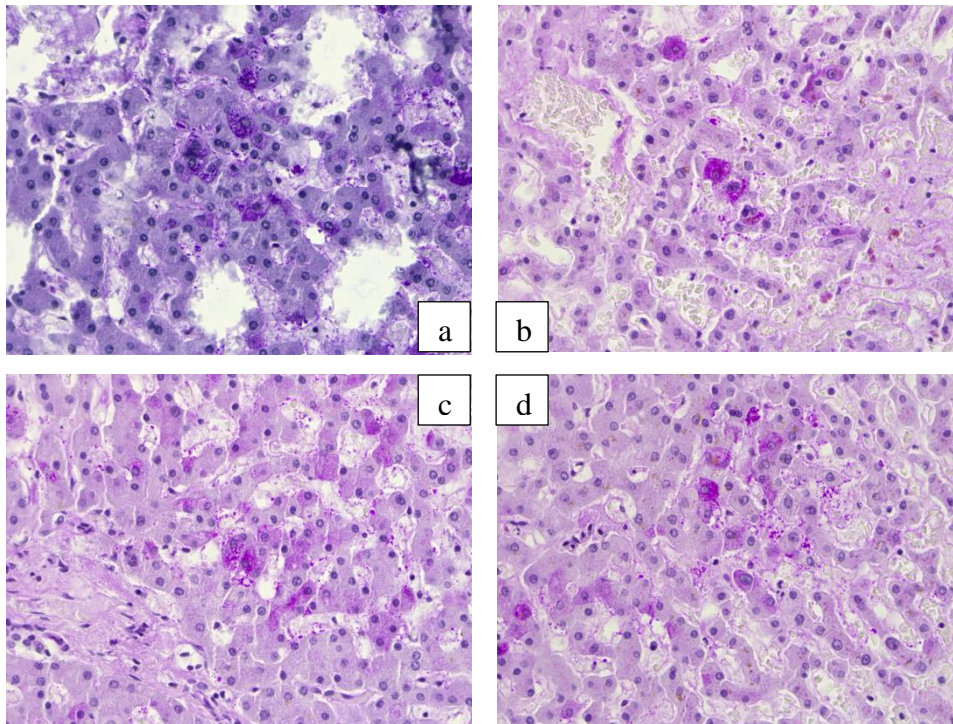
Testivärjäysten tuloksia arvioivat Vaasan keskussairaalan patologian osaston ylilääkäri Marcus Svartbäck, apulaisylilääkäri Edmond Nushi sekä sairaalaselubiologi Pirkko Heino. Patologit ja sairaalaselubiologi antoivat testivärjäyksistä suullista ja vapaamuotoista kirjallista palautetta.

8.1 PAS-värjäyksen optimoinnin tulokset

Yksimielisesti paras PAS-värjäystulos saatiin, kun Weigertin hematoksyliini vaihdettiin Mayerin hematoksyliiniin ja näytteitä inkuboitiin Mayerin hematoksyliinissä 6 minuuttia (Testi 1B) (kuva 11 ja 12).

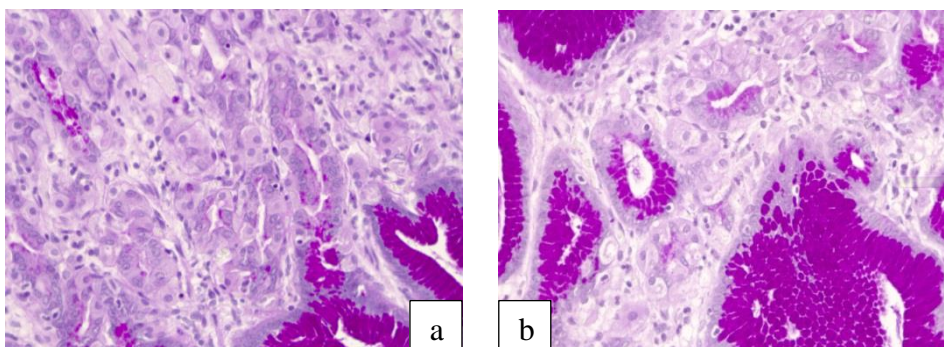


KUVA 11. PAS-optimoinnin värjäystuloksia. Näyte *a*. a) Alkuperäinen PAS b) Mayer 3 min c) Mayer 6 min d) Mayer 9 min



KUVA 12. PAS-optimoinnin tuloksia. Näyte *c*. a) Alkuperäinen PAS b) Mayer 3 min c) Mayer 6 min d) Mayer 9 min

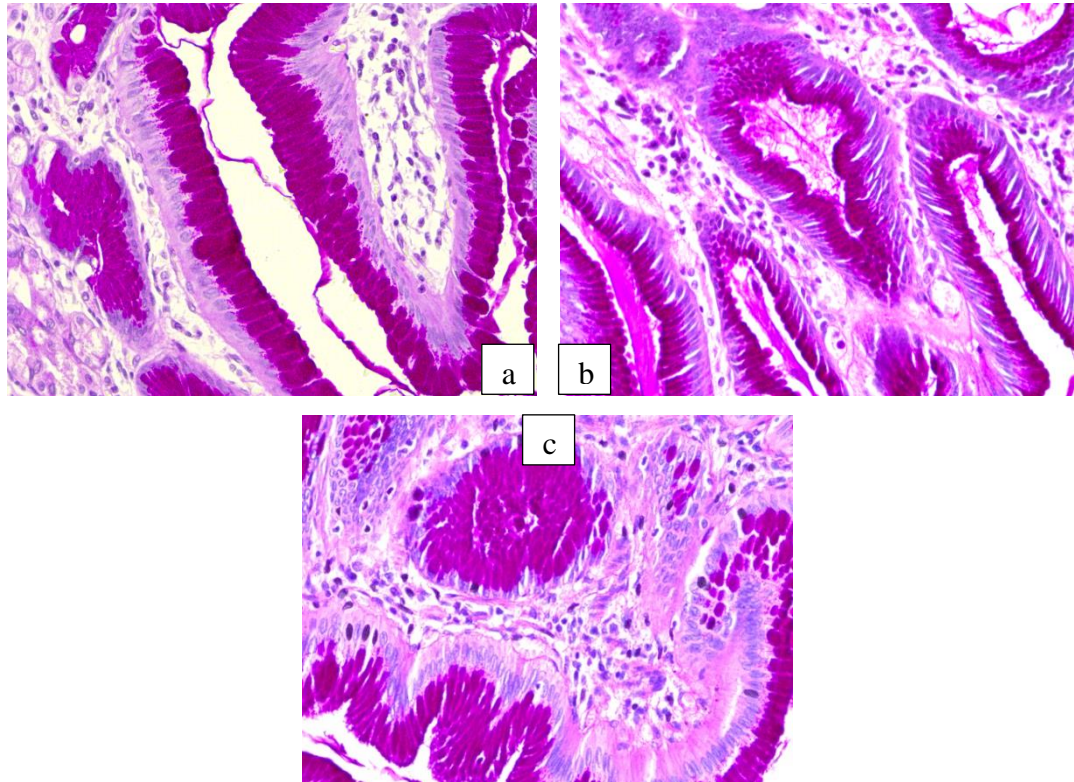
Testissä 4 kokeiltiin 0,5 % perjodihapon toimivuutta 1 % sijaan. Patologien ja sairaalaselubiologin mielestä värjäystuloksen kannalta ei ollut merkitystä, käytettiinkö värjäyksessä 0,5 % vai 1 % perjodihappoa. Testin 4 ja Testin 1B värjäysohjelmat olivat perjodihapon pitoisuutta lukuun ottamatta identtiset ja niiden värjäystulokset vastasivat toisiaan (kuva 13).



KUVA 13. PAS-värjäyksen perjodihappotestaus. Näyte *a*. a) 0,5 % perjodihappo b) 1 % perjodihappo

Testissä 5A kokeiltiin parhaan tuloksen antanutta PAS-värjäysohjelmaa (Testi 1B) värjäysautomaatilla. Värjäysautomaatilla värjätyt näytteet olivat punasävyisempiä kuin vastaavalla käsivärjäysohjelmalla värjätyt näytteet. Samalla värjäysautomaatilla, jolla optimoitavat värjäykset tehtiin, tehdään myös HE-värjäys. Laitteen liuokset vaihdetaan

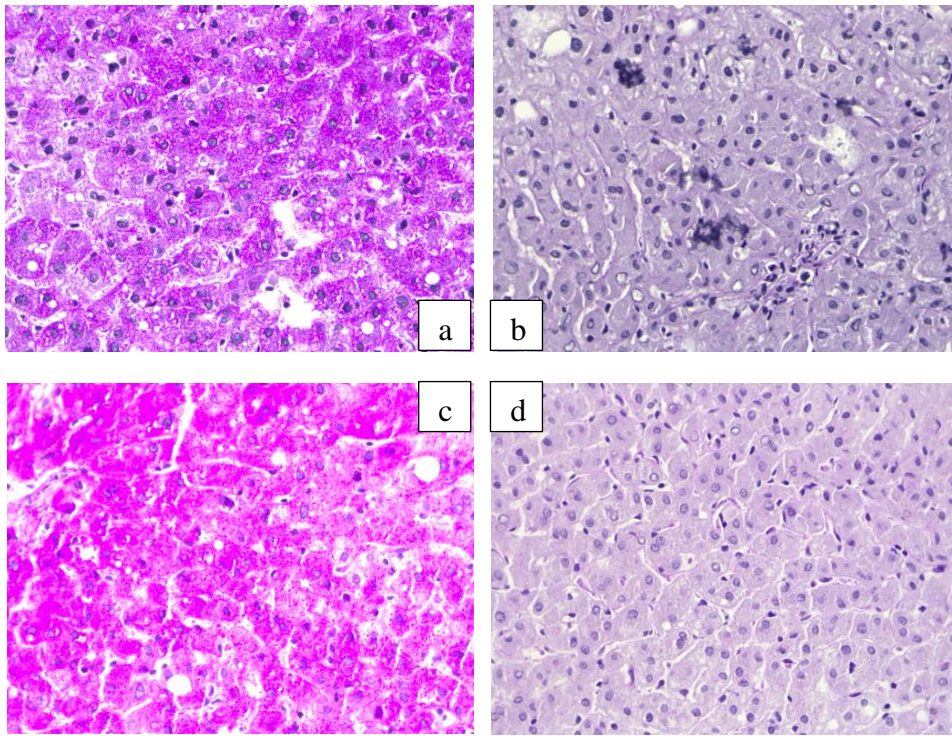
kerran viikossa perjantaisin, osa alkoholeista lisäksi tiistaisin. Testissä 5A rehydraation käytetyt alkoholit olivat samoja kuin HE-värjäyksessä käytetyt. Testi 5A tehtiin torstaina, jolloin liuokset olivat olleet laitteessa lähes viikon. Liian punaisuuden arveltiin johtuvan HE-värjäyksen jälkeisessä rehydraatioissa alkoholeihin siirtyneestä eosiinista. Vertailukelpoisten tulosten saamiseksi konevärjäys toistettiin myöhemmin Testillä 5B, jota varten värjäysautomaattiin vaihdettiin alkoholit. Testin 5B näytteiden värjäystulokset olivat odotetunlaiset ja värjäystulos vastasi Testin 1B värjäystulosta (kuva 14).



KUVA 14. PAS-värjäys, käsi- ja konevärjäyksen vertailu. Näyte *a*. a) Käsivärjäys Testi 1B b) konevärjäys Testi 5A c) konevärjäys Testi 5B

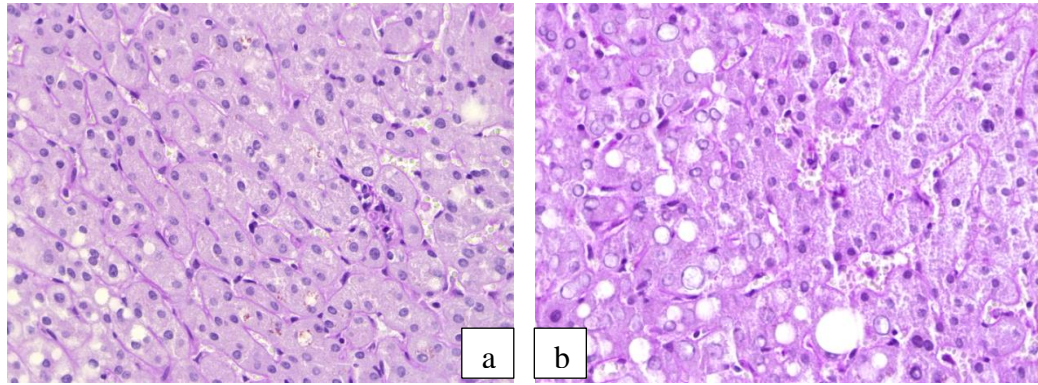
8.2 D-PAS-värjäyksen optimoinnin tulokset

Testi 2 antoi toivotunlaisen D-PAS-värjäyksen. Testin 2 maksanäytteistä tehtyjä D-PAS-värjäyksiä verrattiin vastaaviin, PAS-testauksessa parhaan värjäystuloksen antaneen Testi 1B:n mukaisella PAS-värjäysohjelmalla värjättyihin maksanäytteisiin. Vertailussa todettiin diastaasin toimineen eli näytteiden glykogeeni oli pilkkoutunut. Kuiden minuutin inkubaatioajan Mayerin hematoksyliinissä todettiin sopivan myös D-PAS-värjäykseen (kuva 15).



KUVA 15. D-PAS-värjäys käsin Näyte *d*. a) Alkuperäinen PAS b) alkuperäinen D-PAS c) uusi PAS d) uusi D-PAS.

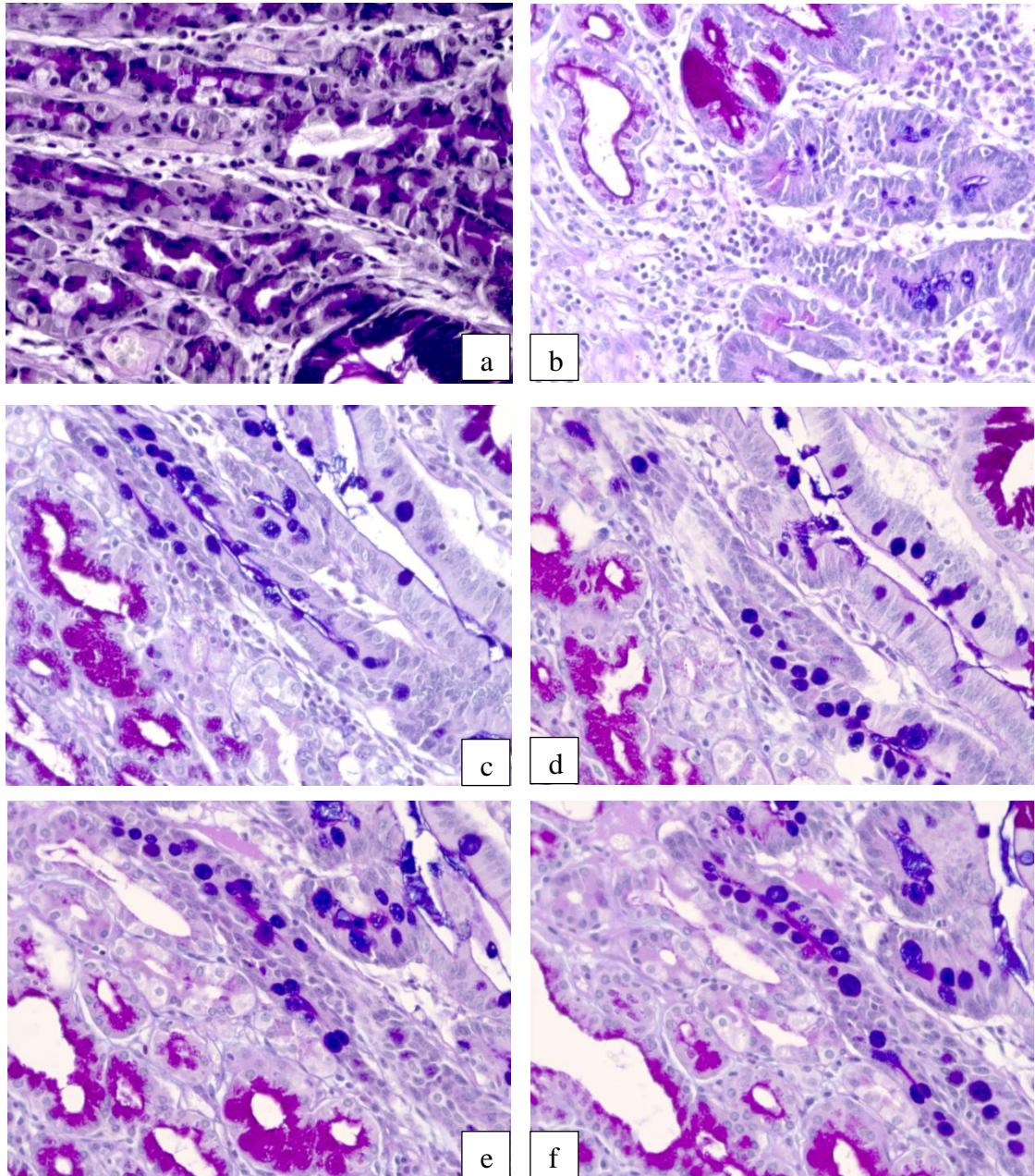
D-PAS-värjäyksen testaus värjäysautomaatilla tapahtui Testillä 6. Testilaseja verrattiin Testin 2 käsin värjättyihin näytelaseihin (kuva 16). Vertaamalla Testin 6 näytelaseja pelkällä Testi 1B:n mukaisella PAS-värjäysohjelmalla värjättyihin näytelaseihin voitiin todeta diastaasin toimineen ja glykogeenin pilkkoutuneen pois. Testin 6 näytelaseja verrattiin myös Testin 2 näytelaseihin eli käsin ja värjäysautomaatilla, uudella D-PAS-ohjelmalla värjättyjä näytelaseja verrattiin keskenään. Testin 6 näytelasien värjäystulokset olivat punertavampia kuin Testin 2 näytelasien. Tämän syynä oletettiin olevan värjäysautomaatissa nousevaan alkoholisarjaan siirtynyt eosini, joka aiheutti myös Testin 5A näytelasien punaisuuden, sillä Testi 5A ja Testi 6 tehtiin samanaikaisesti. Testiä 6 ei kuitenkaan toistettu, koska Testissä 5B osoitettiin näytteiden punaisuuden johtuvan juuri eosiinista.



KUVA 16. D-PAS-värjäys, käsi- ja konevärjäyksen vertailu. Näyte *f.* a) Käsivärjäys Testi 2 b) konevärjäys Testi 6

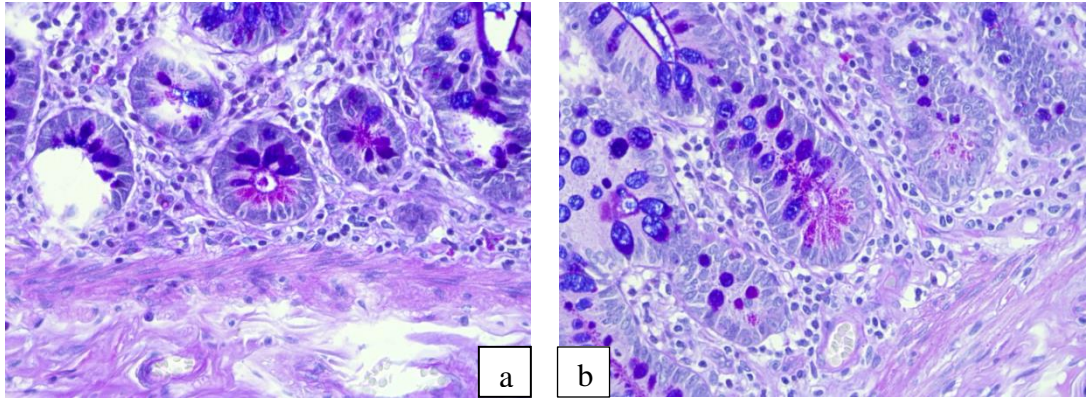
8.3 AB-PAS-värjäyksen optimoinnin tulokset

Testistä 3 paras AB-PAS-värjäystulos saatiin, kun Weigertin hematoksyliini vaihdettiin Mayerin hematoksyliiniin inkubaatioajalla 6 minuuttia ja etikkahappokäsittelyä muutettiin siten, että näytteitä inkuboitii etikkahapossa 10 sekuntia ennen ja jälkeen Alcian blue -käsittelyä (Testi 3E) (kuva 17). Myös Testin 3D tulosta pidettiin hyvänä. Merkittävimmät muutokset aiempaan värjäysohjelmaan verrattuna olivat etikkahappokäsittelyn muuttaminen ja Mayerin hematoksyliinin käyttö. Testissä 3D hematoksyliinin inkubaatioaika oli 4 minuuttia, kun taas Testissä 3E inkubaatioaika oli 6 minuuttia.



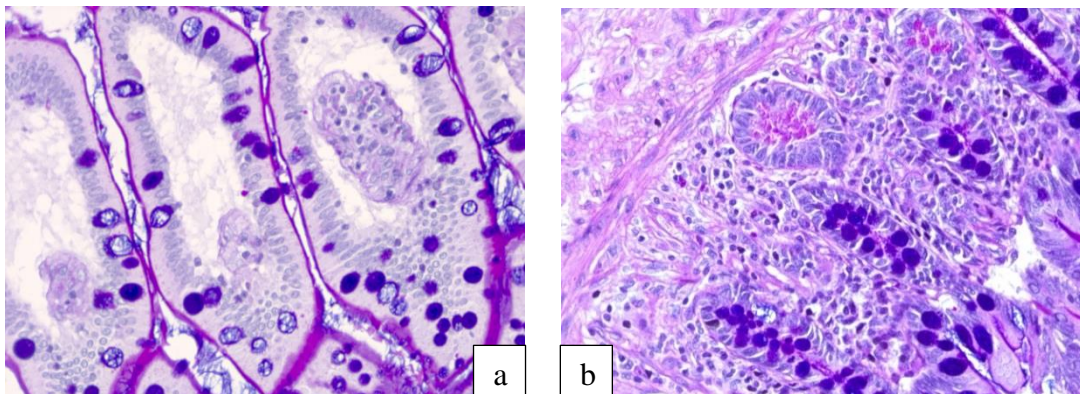
KUVA 17. AB-PAS-optimoinnin tuloksia. Näyte *l*. a) Alkuperäinen AB-PAS b) Testi 3A c) Testi 3B d) Testi 3C e) Testi 3D f) Testi 3E

Testissä 7 0,5 % ja 1 % perjodihappokäsittelyjen värjäystulosten välillä ei havaittu huomattavaa ero värjäytyvydessä (kuva 18). Testissä 7 käytettiin Mayerin hematoksyliinin inkubaatioaikana 5 minuuttia kokeilun vuoksi. Sekä 4 että 6 minuutin inkubaatioajat todettiin hyväksi, minkä vuoksi haluttiin kokeilla, saisiko 5 minuutin inkubaatio aikaan kaikille mieluisan värjäystuloksen.



KUVA 18. AB-PAS-värjäyksen perjodihappotestaus. Näyte *m.* a) 0,5 % perjodihappo
b) 1 % perjodihappo

Testissä 8 osoitettiin Testin 3E mukaisen värjäysohjelman toimivuus värjäysautomaatilla värjätessä. Testin 8 ja Testin 3E näytelasien värjäystulokset olivat samanlaiset (kuva 19).



KUVA 19. AB-PAS-värjäys, käsi- ja konevärjäyksen vertailu. Näyte *m.* a) Käsivärjäys Testi 3E b) konevärjäys Testi 8

8.4 Yhteenveto tuloksista

Reagensseja vaihtamalla ja inkubaatioaikoja muuttamalla pyrittiin optimoimaan PAS-värjäykset. Vaihtamalla PAS-värjäysten tumaväri itsetehdystä Weigertin hematoksyliinista kaupalliseen, valmiiseen Mayerin hematoksyliiniin saatiin Vaasan keskussairaalan patologian osaston PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäysten värjäystuloksia parannettua ja poistettua AB-PAS-värjäyksestä PAS:n ja Alcian bluen välinen epätasapaino.

PAS- ja AB-PAS-värjäyksiin todettiin sopivan niin 0,5 % kuin 1 % perjodihappo. D-PAS-värjäykseen perjodihappopitoisuuden muutosta ei erikseen kokeiltu, sillä kyseinen värjäys on diastaasikäsittelyä lukuun ottamatta sama kuin PAS-värjäys. Tämän takia voidaan olettaa, että 0,5 % perjodihappo soveltuu myös D-PAS-värjäykseen.

9 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäykset Tissue-Tek® DRS 2000 -värjäysautomaatille Vaasan keskussairaalan patologian osastolla. Tavoitteena oli näiden värjäysten osalta histologisten leikkeiden värjäystulosten laadun parantaminen. Optimoinnilla pyrittiin poistamaan värjäyksissä aiemmin esiintyneet, näytteiden mikroskooppista tarkastelua hankaloittaneet artefaktat.

9.1 Etiikka ja luotettavuus

Opinnäytetyön tekemisestä sovittiin kirjallisesti Vaasan keskussairaalan patologian osaston kanssa. Opinnäytetyön kaikissa vaiheissa toimittiin eettisten periaatteiden mukaisesti. Optimoinnissa käytettiin potilas- ja obduktionäytteitä, joita käsiteltiin luottamuksellisesti ja siten, ettei opinnäytetyön yhteydessä potilaita voi näytetietojen perusteella tunnistaa. Obduktionäytteet oli otettu ruumiinavauksien yhteydessä näytteiksi optimointia varten. Tämä on mahdollista lain ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä annetun lain muuttamisesta nojalla (689/2012).

Optimoinnin tuloksia voidaan pitää luotettavina, koska optimoinnit on tehty ohjeita noudattaen ja tarkoituksenmukaisilla, sairaalasolubiologin valitsemilla näytteillä. Näytteet sisälsivät PAS-värjäyksillä värjättävää materiaalia ja ne edustivat eri kudoksia. Näin värjäytymisen onnistumista saatiin tarkasteltua mahdollisimman monipuolisesti. Saadut tulokset on esitetty sellaisenaan, mitään lisäämättä tai poistamatta.

Optimointia tehtäessä työskenneltiin huolellisesti, tarkasti ja vastuullisesti. Optimoinnin aikana tehdyt työvaiheet ja toimet kirjattiin yksityiskohtaisesti tutkimuspäiväkirjaan. Käytetyt näytelasit identifioitiin siten, että niistä käy selkeästi ilmi, mistä näytteestä ja testistä on kyse. AB-PAS-värjäyksen optimoinnin aikana Testissä 3 tapahtuneiden virheiden vuoksi värjäykset toistettiin uusilla leikkeillä eikä virheellisesti värjättyjä näytteitä huomioitu tuloksissa. Nämä inhimilliset virheet sattuivat käsivärjäyksessä ja värjäysautomaattia käytettäessä juuri tällaisia virheitä ei pääse tapahtumaan.

Histologisista värjäyksistä ei ole olemassa yhtä parasta ja oikeaa värjäystulosta, sen on kuitenkin aina oltava tarkoituksenmukainen. Eri tulkitsijoilla on erilainen näkemys siitä, millaiset värien sävyt ja voimakkuudet ovat parhaita, minkä vuoksi värjäystulosten laadukkuuden arviointi on subjektiivista. Tämän työn optimoinnin tulosten arviointi tapahtui vapaamuotoisella suullisella ja kirjallisella palautteella. Värjäystulosten laadukkuudesta olisi saatu objektiivisempaa tietoa, jos arviointia varten olisi laadittu arviointias-teikko. Opinnäytetyön tekijät eivät pitäneet arviointias-teikon laadintaa välttämättömänä, sillä siitä ei katsottu saatavan merkittävää lisäarvoa tulosten tarkasteluun.

Opinnäytetyön teoriataustaa kirjoitettaessa on pyritty käyttämään mahdollisimman alkuperäisiä lähteitä. Histologinen kudosprosessointi ja värjäykset ovat pysyneet jo vuosikymmeniä muuttumattomina. Uudet julkaisut histotekniikasta pohjautuvat näihin vanhoihin julkaisuihin, joita tässäkin opinnäytetyössä on käytetty.

9.2 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Keskeisin tutkimusongelma työssä oli, miten hematoksyliinin vaihtaminen toiseen vaikuttaa värjäystulokseen. Korvaamalla itse tehty Weigertin hematoksyliini kaupallisella Mayerin hematoksyliinilla saatiin PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäystuloksista poistettua häiritsevää sakka ja ylimääräinen taustaväri. Koska Mayerin hematoksyliinia ei ollut käytetty Vaasan keskussairaalan patologian osastolla PAS-värjäyksissä aiemmin, jouduttiin sopiva hematoksyliinin inkubaatioaika hakemaan kokeilemalla. Kokeilun perusteella 6 minuutin inkubaatioaika pidettiin mikroskooppisessa tarkastelussa parhaan värjäystuloksen antaneena aikana.

Värjäystuloksia pyrittiin entisestään parantamaan ja artefaktoja vähentämään muuttamalla hematoksyliinin lisäksi myös useiden muiden liuosten inkubaatioaikoja. Kaikissa värjäyksissä muutettiin perjodihapon, Schiffin reagenssin, vesihuuhteluiden ja kirkastuskysyleenien inkubaatioaikoja. Lisäksi AB-PAS-värjäyksessä muutettiin etikkahappokäsittelyä ja Alcian bluen jälkeisen vesihuuhtelun pituutta. Kaikilla näillä inkubaatioaikojen muutoksilla voidaan olettaa olleen myönteinen vaikutus värjäystuloksiin tai ne lyhensivät värjäysprosessiin kuluva-aikaa värjäystuloksia heikentämättä.

Värjäyksistä ei kokeiltu sellaisia värjäysohjelmia, joissa ainoa muuttuja olisi ollut hematoksyliini. Näin toimittiin, koska optimoinnin tekemiseen oli varattu rajallisesti aikaa, minkä vuoksi värjäysohjelmien suunnittelussa jouduttiin tekemään kompromisseja. Näin ollen inkubaatioaikojen muutosten vaikutusta värjäystulosten paranemiseen ei voida suoraan osoittaa. Muutokset eivät kuitenkaan heikentäneet värjäystuloksia, sillä ne otettiin osaksi uusia värjäysohjelmia. Voidaan siis todeta, että muutetut inkubaatioajat sopivat uusiin värjäysohjelmiin.

AB-PAS-värjäystä optimoitaessa tehtiin testivärjäykset, joissa vaihdettiin Weigertin hematoksyliini Mayerin hematoksyliiniin ja etikkahappoinkubaatioon tehtiin vähäinen muutos. Testin muissa osissa inkubaatioaikoihin tehtiin enemmän muutoksia ja nämä testivärjäykset olivat parempia kuin ne, joissa inkubaatioaikojen muutokset olivat vähäisempiä. Näin voidaan todeta kaikilla inkubaatioaikojen muutoksilla olleen positiivinen vaikutus AB-PAS-värjäystulokseen. AB-PAS-värjäyksen optimoinnin tavoitteena oli löytää tasapaino Alcian bluen ja PAS:n välillä ja tässä onnistuttiin.

Perjodihapon pitoisuuden pienentämisellä ei havaittu olevan vaikutusta PAS- ja AB-PAS-värjäystuloksiin. Tämä oli odotettavissa, sillä kirjallisuudessa perjodihapon pitoisuudeksi PAS-värjäyksissä suositellaan joko 1 %:a tai 0,5 %:a (Luna 1968, 159; Cook 1974, 16; Luna 1992, 374–375; Prophet ym. 1992, 151; Bancroft & Gamble 2002, 175; Kiernan 2008, 293;). Tulosten perusteella Vaasan keskussairaalan patologian osasto voisi siirtyä käyttämään 0,5 % perjodihappoa aiemmin käytetyn 1 % sijaan. Tämä puollittaisi perjodihapon menekin ja siitä syntyvät kustannukset.

Kaikki kudoksen prosessointivaiheet vaikuttavat värjäystulokseen (Wallington 1979, 3; Bancroft & Gamble 2002, 85). Vaasan keskussairaalan patologian osaston muiden värjäysten tulokset ovat hyviä, joten laboratorion kudosprosessoinnin voidaan olettaa toimivan hyvin. Tätä olettamusta tukee se, että vain värjäysohjelmia muuttamalla saatiin värjäystuloksia parannettua eli artefaktat johtuivat itse värjäyksistä tai niissä käytetyistä liuoksista.

Värjäystuloksen arvioinnin ongelmana on se, ettei värjäystulosta voi mitata, vaan värjäystuloksen laatu on tarkastelijan subjektiivinen näkemys. Värjäystuloksen onkin hyvä olla juuri lausuntoa antavan patologin mielestä mieluinen. Optimoinnissa saatuja vär-

jäystuloksia arvioivat ne patologit, jotka tutkivat näillä värjäyksillä jatkossa värjättäviä näytteitä.

Opinnäytetyön ansiona voidaan onnistuneen optimoinnin lisäksi pitää kattavaa selvitystä histologisissa näytteissä esiintyvistä artefaktoista. Opinnäytetyön teoretietoa voidaan hyödyntää bioanalyttikoiden koulutuksessa lisämateriaalina sekä patologian laboratorioissa perehdytysmateriaalina ja värjäysten ongelmatilanteiden selvittelyn apuna. Aikaisempia opinnäytetöitä histologisten värjäysten optimoinnista tai artefaktoista ei ammattikorkeakoulujen verkkokirjasto Theseuksesta löydy.

Teoriatiedon kokoamisen myötä opinnäytetyön tekijöiden tietämys histologisten näytteiden prosessoinnista ja sen vaikutuksista näytteeseen lisääntyi. Optimoinnin tekeminen opetti paljon värjäysten ongelmista ja niiden ratkaisemisesta. Opinnäytetyöprosessin aikana yhteistyö sekä opinnäytetyön tekijöiden välillä että ohjaajien ja työelämän edustajien kanssa oli sujuvaa ja hyvää.

Tämä Tampereen ammattikorkeakoulussa tehty opinnäytetyö ei ole puhtaasti tieteellinen tutkimus, kuitenkin työ noudattaa kokeellisen tutkimuksen periaatteita. Tarve työn tekemiselle tuli Vaasan keskussairaalan patologian osastolta ja optimointi tehtiin työelämän toiveisiin vastaten.

PAS-, D-PAS- ja AB-PAS-värjäykset ovat yleisesti käytettyjä erikoisvärjäyksiä Vaasan keskussairaalan patologian osastolla ja siksi koettiin tärkeäksi, että värjäykset optimoitiin mahdollisimman hyväksi. Mayerin hematoksyliini ja uudet värjäysohjelmat eivät vielä ole käytössä Vaasan keskussairaalan patologian osastolla, mutta ne tullaan myöhemmin ottamaan käyttöön. Tulevilla ulkoisilla laadunarviointikierroksilla voidaan näistä värjäyksistä odottaa saatavan aikaisempaa parempia tuloksia. Lisäksi optimoinnin ansiosta patologioiden tekemä värjäystulosten tulkinta helpottuu.

Patologis-anatominen lausunto voidaan antaa tarkoituksenmukaisesta, mutta teknisesti puutteellisesta näytteestä. Selkeä, siisti ja onnistunut värjäys kuitenkin helpottaa lausuntoa antavan patologin työtä. Mikäli jatkossa histologisissa värjäyksissä havaitaan värjäystulosten tason laskua, ehdotetaan jatkotutkimusaiheena kyseisten värjäysten optimointia.

LÄHTEET

Aho, H. 1989. Histologiset menetelmät patologiassa. Turku: Turun yliopisto, Kliinisteoreettinen laitos, Patologia.

Anderson, J. 2011. An Introduction to Routine and Special Staining. Leica Biosystems. Luettu 14.3.2013. <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-routine-and-special-staining/>

Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. 5. painos. Iso-Britannia: Churchill Livingstone.

Beresford, W. A. Histology. Morgantown, USA. Luettu 12.3.2013. <http://wberesford.hsc.wvu.edu/histol.htm>.

Brown, J. A. & Smoller, B. R. 2010. Special Stains in Dermatopathology. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology Education Guide. Special Stains and H&E. 2. painos. Tanska: Dako. 199–204.

Chayen, J., Bitensky, L. & Butcher, R. G. 1973. Practical Histochemistry. Iso-Britannia: John Wiley & Sons.

Cook, H. C. 1974. Manual of Histological Demonstration Techniques. Lontoo, Iso-Britannia: Butterworths.

Dapson R. W. & Horobin R. W. 2009. Dyes from a twenty-first century perspective. Biotechnic & Histochemistry 84 (4), 135–137.

Dapson, Horobin & Kiernan. 2009. Hematoxylin shortages: their causes and duration, and other dyes that can replace hemalum in routine hematoxylin and eosin staining. Biotechnic & Histochemistry 85(1): 55–63.

Dettmeyer, R., B. 2011. Staining Techniques and Microscopy. Forensic Histopathology. Berliini, Saksa: Springer-Verlag.

Floyd, A. D. 2010. Evolution of Use of Special Stains. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology Education Guide. Special Stains and H&E. 2. painos. Tanska: Dako, 39–44.

Gill, G. W. 2010. H&E Staining: Oversights and Insights. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology Education Guide. Special Stains and H&E. 2. painos. Tanska: Dako, 119–130.

Haque, A. 2010. Special Stains Use in Fungal Infections. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology Education Guide. Special Stains and H&E. 2. painos. Tanska: Dako, 233–240.

Horobin, R. W. 2010. How Do Dyes Impart Color to Different Components of the Tissues. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology Education Guide. Special Stains and H&E. 2. painos. Tanska: Dako, 159–166.

Horobin, R. W. & Bancroft, J. D. 1998. *Troubleshooting Histology Stains*. New York, USA: Churchill Livingstone.

Iwase, T., Masuda, Y., Suzuki, T., Takahashi, O. & Miyazaki, M. 2013. Advanced small-cell colon carcinoma: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 74 (4).

Kiernan, J. A. 2008. *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice*. 4. painos. Iso-Britannia: Scion Publishing Ltd.

Kiernan, J. A. 2010a. *Carbohydrate Histochemistry*. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) *Pathology Education Guide. Special Stains and H&E*. 2. painos. Tanska: Dako, 75–92.

Kiernan, J. A. 2010b. *General Oversight Stains for Histology and Histopathology*. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) *Pathology Education Guide. Special Stains and H&E*. 2. painos. Tanska: Dako, 29–36.

Kiernan, J. A. 2010c. *On Chemical Reactions and Staining Mechanisms*. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) *Pathology Education Guide. Special Stains and H&E*. 2. painos. Tanska: Dako, 167–176.

Kumar, G. L. & Gill, G. W. 2010. *Introduction to Special Stains*. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) *Pathology Education Guide. Special Stains and H&E*. 2. painos. Tanska: Dako, 1–28.

Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä annetun lain muuttamisesta. 30.11.2012/689.

Lillie R. D. & Pizzolato P. 1972. Mechanism of Iron II and Iron III Sequence hematoxylin stains. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 20 (2), 116–129 .

Llewellyn, B. D. 2009. Nuclear staining with alum hematoxylin. *Journal of Biotechnic & Histochemistry* 84 (4), 159–177.

Luna, L. G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3. painos. USA: McGraw-Hill Book Company.

Luna, L. G. 1992. *Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts*. USA: American Histolabs, Inc.

Lääketieteen termit. 2011. Terminologian tietokannat. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 27.5.2013.

<http://www.terveysportti.fi>

Myers, R. 2009. *Special Stain Techniques for the Evaluation of Mucins*. Wetzlar, Saksa. Leica Biosystems. Luettu 13.8.2013.

<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/special-stain-techniques-for-the-evaluation-of-mucins/>

- Myers, R. 2011. The Basic Chemistry of Hematoxylin. Leica Biosystems. Luettu 15.3.2013.
<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/the-basic-chemistry-of-hematoxylin/>
- Mäkinen, M. & Lehto, V-P. 2012. Patologian kaksoisluonne ja integratiivinen lääketiede. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Naukkarinen, A. 2000. Histologiset värjäykset. *Moodi* 24 (4-5), 153–158.
- Nowacek, J. M. 2010. Fixation and tissue processing. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology Education Guide. Special Stains and H & E. 2. painos. California, USA: Dako.
- Operating Manual. 2010. Sakura Tissue-Tek® DRS 2000.
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B. & Sobin, L. H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. USA: American Registry of Pathology.
- Rolls, G. 2008. 101 Steps to Better Histology – a Practical Guide to Good Histology Practice. Weztlar, Saksa: Scientia. Leica Microsystems' Education Series.
- Rolls, G. 2011. An Introduction to Specimen Preparation. Leica Biosystems. Luettu 16.5.2013.
<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-specimen-preparation/>
- Rolls, G. O., Farmer, N. J. & Hall, J. B. 2012. Artifacts in Histological and Cytological Preparations. Wertzlar, Saksa: Scientia. Leica Biosystems' Education Series.
- Saxena, R. 2010. Special Stains in Interpretation of Liver Biopsies. Teoksessa Kumar, G. L. & Kiernan, J. A. (toim.) Pathology Education Guide. Special Stains and H&E. 2. painos. Tanska: Dako, 107–118.
- Scouten, C. W. 2010. Knife Angle in Microtomy. Leica Biosystems. Luettu 17.5.2013.
<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/knife-angle-in-microtomy/>
- Smith, A. A. 2010. Hematein chelates of unusual metal ions for tinctorial histochemistry. *Biotechnic & Histochemistry* 85 (1): 43–54.
- Thompson, S. W. & Luna, L. G. 1978. An Atlas of Artifacts Encountered in the Preparation of Microscopic Tissue Sections. USA: Charles C. Thomas.
- Titford, M. 2005. The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry* 80 (2), 73–78.
- Wallington, E. A. 1979. Artifacts in tissue sections. *Medical Laboratory Science* 36 (1), 3–61.

LIITTEET

Liite 1. PAS-optimoinnin värjäysohjelmat.

Asema	Liuos	Vanha ohjelma (min)	Testi 1A (min)	Testi 1B (min) Testi 5	Testi 1C (min)	Testi 4
27	Start					
Dry	kuivaus	5	5	5	5	5
1	xyl	5	5	5	5	3
2	xyl	3	3	3	3	3
3	abs	3	3	3	3	3
4	abs	3	3	3	3	3
5	96 %	3	3	3	3	3
6	96 %	3	3	3	3	3
26	aqua	2	2	2	2	2
10	1 % perjodihappo	10	5	5	5	(0,5 %) 5
21/22/23	juokseva vesi	2	3	3	3	3
11	Schiff	10	12	12	12	12
21/22/23	juokseva vesi	10	10	10	10	10
12	hematoksyliini	Weigert 8	Mayer 3	Mayer 6	Mayer 9	Mayer 6
21/22/23	juokseva vesi	10	10	10	10	10
25	96 % (80 %)	3	3	3	3	3
24	96 %	3	3	3	3	3
20	96 %	3	3	3	3	3
19	abs	3	3	3	3	3
18	abs	3	3	3	3	3
17	abs	3	3	3	3	3
16	xyl	2	5	5	5	5
15/14 (exit)	xyl	2	5	5	5	5

xyl = ksyleeni, abs = absoloitu alkoholi, 96 % = 96 % alkoholi, 96 % (80 %) = käsivärjäyksessä 80 % alkoholi, konevärjäyksessä 96 % alkoholi, 15/14 (exit) = konevärjäyksessä ei inkubaatiota, ohjelma päättyy

Liite 2. D-PAS-optimoinnin värjäysohjelmat.

Asema	Liuos	Vanha ohjelma (min)	Testi 2, Testi 6
27	Start		
10	1 % perjodihappo	10	5
21/22/23	juokseva vesi	2	3
11	Schiff	10	12
21/22/23	juokseva vesi	10	10
12	hematoksyliini	Weigert 8	Mayer 6
21/22/23	juokseva vesi	10	10
25	96 % (80 %)	3	3
24	96 %	3	3
20	96 %	3	3
19	abs	3	3
18	abs	3	3
17	abs	3	3
16	xyl	2	5
15/14 (exit)	xyl	2	5

xyl = ksyleeni, abs = absoloitu alkoholi, 96 % = 96 % alkoholi, 96 % (80 %) = käsivärjäyksessä 80 % alkoholi, konevärjäyksessä 96 % alkoholi, alkoholi, 15/14 (exit) = konevärjäyksessä ei inkubaatiota, ohjelma päättyy

Liite 3. AB-PAS-optimoinnin Testi 3:n värjäysohjelmat.

Asema	Liuos	Vanha ohjelma (min)	Testi 3A (min)	Testi 3B (min)	Testi 3C (min)	Testi 3D (min)	Testi 3E (min)
27	start	5	5	5	5	5	5
Dry	kuivaus	5	5	5	5	5	5
1	xyl	5	5	5	5	5	5
2	xyl	5	5	5	5	5	5
3	abs	3	3	3	3	3	3
4	abs	3	3	3	3	3	3
5	96 %	3	3	3	3	3	3
6	96 %	3	3	3	3	3	3
26	aqua	2	2	2	2	2	3
13	3 % etikkahappo	3	1	1	10 s	10 s	10 s
9	Alcian Blue	30	30	30	30	30	30
13	3 % etikkahappo	-	-	-	10 s	10 s	10 s
21/22/23	juokseva vesi	10	10	10	1	1	1
10	1 % perjodihappo	10	10	10	5	5	5
21/22/23	juokseva vesi	2	2	2	1	1	1
11	Schiff	10	10	10	12	12	12
21/22/23	juokseva vesi	10	10	10	10	10	10
12	hematoksyliini	8	Mayer 3	Mayer 6	Mayer 2	Mayer 4	Mayer 6
21/22/23	juokseva vesi	10	10	10	10	10	10
25	96 % (80 %)	3	3	3	3	3	3
24	96 %	3	3	3	3	3	3
20	96 %	3	3	3	3	3	3
19	abs	3	3	3	3	3	3
18	abs	3	3	3	3	3	3
17	abs	3	3	3	3	3	3
16	xyl	2	2	2	5	5	5
15/14 (exit)	xyl	2	2	2	5	5	5

xyl = ksyleeni, abs = absoloitu alkoholi, 96 % = 96 % alkoholi, 96 % (80 %) = käsvärjäyksessä 80 % alkoholi, konevärjäyksessä 96 % alkoholi, 15/14 (exit) = konevärjäyksessä ei inkubaatiota, ohjelma päättyy

x
1

Liite 4. AB-PAS-värjäyksen Testi 7:n värjäsohjelmat.

Asema	Liuos	Vanha ohjelma (min)	Testi 7A (min)	Testi 7B (min)
27	start	5	5	5
Dry	kuivaus	5	5	5
1	xyl	5	5	5
2	xyl	5	5	5
3	abs	3	3	3
4	abs	3	3	3
5	96 %	3	3	3
6	96 %	3	3	3
26	aqua	2	2	2
13	3 % etikkahappo	3	10 s	10 s
9	Alcian Blue	30	30	30
13	3 % etikkahappo	-	10 s	10 s
21/22/23	juokseva vesi	10	1	1
10	1 % perjodihappo	10	(0,5 %) 5	5
21/22/23	juokseva vesi	2	1	1
11	Schiff	10	12	12
21/22/23	juokseva vesi	10	10	10
12	hematoksyliini	8	Mayer 5	Mayer 5
21/22/23	juokseva vesi	10	10	10
25	96 % (80 %)	3	3	3
24	96 %	3	3	3
20	96 %	3	3	3
19	abs	3	3	3
18	abs	3	3	3
17	abs	3	3	3
16	xyl	2	5	5
15/14 (exit)	xyl	2	5	5

xyl= xyl= ksyleeni, abs = absoloitu alkoholi, 96 % = 96 % alkoholi, 96 % (80 %) = käsivärjäyksessä 80 % alkoholi, konevärjäyksessä 96 % alkoholi,
15/1 15/14 (exit) = konevärjäyksessä ei inkubaatiota, ohjelma päättyy