



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

Opetusvideot mikrotomien käytöstä

Ilja Pesonen

Joona Stålhane

Opinnäytetyö
Elokuu 2018
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

PESONEN, ILJA & STÅLHANE, JOONA:
Opetusvideot mikrotomien käytöstä

Opinnäytetyö 21 sivua
Elokuu 2018

Histologia on patologian osa-alue, joka tutkii kudoksen rakenteita ja muutoksia. Histologinen prosessi kattaa kudoksen käsittelyn aina mikroskooppipreparaatiksi asti. Kudoksen leikataankin työvälillä nimeltä mikrotomi. Laadukkaiden leikkeiden aikaansaamiseksi on mikrotomin käyttö hallittava. Mikrotomeilla leikkauksen harjoittelu kuuluu bioanalytikon koulutukseen. Opiskelijat leikkaavat kudoksen kliinisen histologian harjoitustunneilla.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli tuottaa kolme opetusvideota Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytikko-opiskelijoille. Oppimateriaali on tarkoitettu käytettäväksi kliinisen histologian harjoitustunneilla, sekä tueksi itseopiskeluun. Opinnäytetyö toteutettiin toiminnallisena opinnäytetyönä, jonka tilaajana oli Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyön tuotos on opetusvideot, jotka on suunnattu bioanalytikko-opiskelijoille Tampereen ammattikorkeakoulun mikrotomien käytöstä. Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää opiskelijoiden mikrotomeilla työskentelyä ja antaa heille hyvä tieto ja taitopuusta histologian harjoittelujaksolle.

Toiminnallinen opinnäytetyö sisältää toiminnallisen osuuden ja opinnäytetyöraportin. Tämän opinnäytetyön toiminnallinen osuus on kolme Tampereen ammattikorkeakoulun mikrotomin opetusvideota. Videoista kaksi ovat noin neljän minuutin pituisia ja yksi on noin kuuden minuutin pituinen. Opetusvideosta ilmenee mikrotomien käyttökuntoon laitto, niillä toimiminen, purku ja huolto. Opinnäytetyön raporttiosuus käsittelee koko histologista prosessia. Videoiden pääpaino on mikrotomien käytössä eikä niinkään esimerkiksi laadullisen leikkeen tuottamisessa. Siksi hyvä jatkoehdotus olisi opetusvideo laadukkaiden leikkeiden leikkaaminen mikrotomilla.

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

PESONEN, ILJA & STÅLHANE, JOONA:
Educational videos on Operating Microtomes

Bachelor's thesis 21 pages
August 2018

Histology is part of pathology, that examines structures and changes of tissue sample. Histology processes include the handling of tissue sample all the way to a microscopical prepare. Tissue samples are cut with a tool called a microtome. To obtain high-quality samples, the user must master handling the microtome. The practice of cutting with microtome is a part of biomedical laboratory scientist's education, and the students practice cutting tissue samples in histology lessons.

The purpose of this practice-based study was to produce three educational videos for biomedical laboratory scientist students of Tampere University of Applied Sciences. The teaching material is intended to be used in practical pathology lessons, and also as self-study support. The goal of this study is to develop students' working skills with microtome and to provide them with a good base of knowledge and skills for the practical pathology lessons.

This study contains a functional part and a thesis report. The functional part of this thesis are three educational videos on microtomes. Two of the videos are approximately four minutes long and one is approximately six minutes long. The teaching videos cover information on assembling the microtomes, operating and disassembling them, as well as maintenance. The report part of the study covers the entire histology process. The main focus of the videos is on operating the microtomes, while less attention is paid on for example preparing high-quality sections. Therefore, in a potential further study similar educational videos could be produced on how to prepare high-quality sections with a microtome.

Keywords, histology, pathology, microtome, educational video

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	HISTOLOGISET MENETELMÄT	6
3	HISTOLOGISEN NÄYTTEEN PROSESSOINTI	7
3.1	Kudospreparaatti	7
3.2	Näytteen vastaanotto	7
3.3	Dissekointi	8
3.4	Histologisen näytteen leikkaaminen	9
3.5	Värjäys	10
3.6	Päällystäminen	11
3.7	Jääleikkeet.....	11
4	TOIMINNALLINEN OPINNÄYTETYÖ	12
5	TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULUN MIKROTOMIT	13
5.1	Liukumikrotomi Sledge Microtome LEITZ 1208	13
5.2	Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific Microtom HM340E	14
5.3	Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific HM340E ja Microtom STS- vesihaude	15
6	TOTEUTUS JA TUOTOS	16
7	POHDINTA.....	18
	LÄHTEET.....	20

1 JOHDANTO

Mikrotomi on leikkaustyökalu, jolla leikataan histologiseen tukiaineeseen, esimerkiksi parafiiniin valettua mikroskoipoitavaa biologista solu- tai kudospäytteitä ohuiksi leikkeiksi ja kiinnitetään mikroskooppista tarkastelua varten objektilasille. Kudospäytteiden paksuus vaihtelee 1-5 μm välillä, riippuen millaiseen tarkoitukseen leikkeen haluaa. Leikkeen tulee olla laadukas ja ehjä, eikä siinä ei saa olla esimerkiksi rypyjä. Onnistunut kudospäyte mahdollistaa yksityiskohtaisen kudospäyteiden tarkastelun patologian laboratoriossa, missä tutkitaan erilaisia kudospäytteitä ja kudospäyteiden muutoksia.

Opinnäytetyömme tarkoitus on tuottaa Tampereen ammattikorkeakoululle, kolme laadukasta opetusvideota koulun omien mikrotomien käytöstä. Videot ovat suunniteltu käytettäväksi oppitunneilla, sekä itseopiskelun tukena. Videoihin sisältyy mikrotomien käyttökuntoon laitto, kudospäyteiden leikkaaminen, leikkeiden siirto lasille, laitteiden purku ja puhdistus. Opinnäytetyömme tavoitteena on tukea bioanalyttikko-opiskelijoiden mikrotomien kanssa työskentelyä koulun harjoitustunneilla ja antaa heille hyvä pohja patologian harjoitusjaksoa varten.

Opinnäytetyömme on toiminnallisena opinnäytetyönä toteutettu. Opetusvideot ovat Tampereen ammattikorkeakoulun tilaamat. Toiminnalliseen opinnäytetyöhömme sisältyy tuotos eli opetusvideot sekä kirjallinen osuus eli opinnäytetyöraportti. Kirjallinen osuus käsittelee patologiaa, histologisia menetelmiä, mikrotomeja ja toiminnallista opinnäytetyötä.

2 HISTOLOGISET MENETELMÄT

Patologian suomenkielinen vastine on tautioppi. Se on oppi sairauksiin liittyvistä rakenteellisista ja toiminnallisista muutoksista solu-, kudus-, ja elimistötasolla. Patologiassa selvitetään sairauksia organismitasolla ja mekanismeja selvittävässä tutkimuksissa. Organismitasolla tutkitaan ja yritetään löytää biologisesti ja muuten uskottavia selitysmalleja sairauksiin. Mekanismeja selvittävässä perustutkimuksessa etsitään kausaalisia mekanismeja, joilla voidaan selittää sairauksia. Patologian tärkeimpiä tehtäviä ovat sairauksien tunnistaminen ja kuvaus, sekä niiden syytekijöiden selvittäminen. (Lehto & Mäkinen, 2012.)

Patologian laboratorioden valmiustasot vaihtelevat laboratorioden koon mukaan. Yliopistosairaaloissa on usein koko tutkimuslaitteisto ja niihin on keskitetty muun muassa lihasbiopsiat, sydänlihasbiopsiat, elektronimikroskooppitutkimukset ja neuropatologiset tutkimukset. Keskussairaaloissa on usein laajat valmiudet eri tyyppisten patologisten näytteiden tutkimiseen. Pienemmät yksiköt voivat lähettää harvinaisemmat näytteet suurempiin yksiköihin. Yksityisten laboratorioden valmiudet vaihtelevat huomattavasti. (Lehto & Mäkinen 2012.)

Histologia ja sytologia muodostavat patologian eli tautiopin laboratorion. Histologialla tutkitaan erilaisia kudospäytteitä, kuten tähyystysten yhteydessä otetut koepalat, leikkauksissa poistetut kasvaimet tai muut kudospäytteet kuten luomet. Kuduskäsittelyn ja värjäysprosessin tarkoituksena on käsitellä näytteet sellaiseksi, että patologi voi antaa niistä lausunnon. Histologian laboratoriossa käytetään automaatteja kudospäynteeseen ja värjäykseen, mutta edelleen suuri osa työstä on käsityötä, joka vaatii hyvää silmän ja käden koordinaatiota. Sytologialla tutkitaan kehon nesteitä kuten virtsaa, pleuranestettä, ysköksiä ja selkäydinnestettä. Näytteistä valmistetaan preparaatteja objektilaseille, joista etsitään syöpäsoluja. Ennen patologin lausuntoa, on bioanalyytikon tehtävä esitarkastaa sytologiset preparaatit. (Suomen bioanalytikkoliitto ry. N.d)

3 HISTOLOGISEN NÄYTTEEN PROSESSOINTI

Histologisen näytteen prosessoinnilla tarkoitetaan toimenpiteitä, joiden avulla kudokset saadaan mikroskoopilla tarkasteltavaan muotoon. Prosessoinnin päämäärä on kudoksen olomuodon säilyttäminen sellaisessa muodossa missä se vastaisi elintä. Kudostenäytteiden käsittely pitää sisällään näytteen fiksaation, vastaanoton ja numeroinnin, dissektion, kuljetuksen, valamisen, leikkaamisen, värjäämisen sekä päällystyksen. (Niskanen 2001, 10.)

3.1 Kudospreparaatti

Fiksaatio on tärkein vaihe kudostenäytteen prosessissa, sillä sen tarkoituksena on säilyttää kudostenäytteen rakenne mahdollisimman alkuperäisen kaltaisena. Fiksaation avulla estetään solujen ja kudosten entsyymaattinen hajoaminen, lopetetaan solujen aineenvaihdunta, eliminoidaan virukset, bakteerit ja fungit, sekä kovetetaan kudosta. (Ross & Pawlina 2005, 2.) 10% formaliini on yleisimmin käytetty fiksaatiivi diagnostisessa patologiassa. (Bancroft & Gamble 2003, 56). Formaliini on formaldehydin 37 % vesiliuos. Formaldehydi pelkistyy metanoliksi ja hapettuu muurahaishapoksi vesiliuoksessa. Fiksaatioaika 12-18 h, pitempi aikaväli aiheuttaa formaliinipigmentin muodostumista. Fiksaatiolla on vaikutuksia näytteen leikkautuvuuteen, värjäytyvyyteen ja morfologiaan. (Naukkari 2003, 8-9.)

3.2 Näytteen vastaanotto

Näytteen käsittely patologian laboratoriossa näytteen saapumisesta valmistumiseen kestää vähintään 3-5 päivää, jonka jälkeen patologi arvioi näytteen. Lähetteen ja näytepurkkien saavuttua patologian laboratorioon, näytteille annetaan ominainen koodi, joka sisältää seuraavat tiedot: näytetyyppi, vuosiluku, laboratorion yksilöivä tunniste, juokseva näytenumero ja alanumero tai kirjainyhdistelmä, jolla määritetään, monesko näyteblokki on kyseessä. (Mäkinen, 2012.)

3.3 Dissekointi

Näytteet vastaanotetaan ja numeroidaan, jonka jälkeen tapahtuu dissektio. Dissektiossa tehdään tarvittaessa piirros tai sanelu elimestä, mitataan ja punnitaan elin, merkataan kasettien lukumäärä ja dissekoijien nimikirjaimet. Näyte voidaan myös valokuvata. (Niskanen 2003, 10.) Näytteestä mitataan erikseen muutoskohdat ja lopuksi merkitään kasettien lukumäärä. Pieniä koepaloja ja esimerkiksi eturauhasen höyläysnäytteitä ei yleensä tarvitse dissekoida. Suuremmissa näytteissä, kuten poistetuissa luomissa ja niitä suuremmissa kirurgisissa näytteissä tulee näytteet dissekoida. (Mäkinen, 2012.)

Hyvä käytäntö olisi valokuvata tai piirtää ja kuvailla mahdollisimman tarkasti näytteen orientoituminen myöhempää tarkastelua varten. Tällöin patologi kykenee selvittämään suurimman osan keskeisistä ennustetekijöistä kuten, kasvaimen tyyppin, koon, paikallisen imu – tai verisuoni-invaasion. Blokkeja kertyy eri näytteistä eri määriä, vaativat syöpäresekaatit voivat tarvita useita kymmeniä blokkeja. (Mäkinen, 2012.)

Kun näyte on dissekoitu, on vuorossa kuljetus. Näyte pestään ja dehydroidaan nousevalla alkoholisarjalla, jolloin vesi poistuu näytteestä. Dehydrintiin käytetään muun muassa etanolia tai metanolia. Dehydraation aika riippuu kudoksen laadusta, koosta, käytetyistä liuoksista, lämpötilasta, näytteiden liikuttelusta ja paineesta. (Naukkarinen 2003, 11.) Dehydraation jälkeen näyte kirkastetaan eli näytteestä poistetaan alkoholi, tähän käytettävä aineita, jotka liukenevat sekä parafiiniin että alkoholiin. Tähän käytetään esimerkiksi tolueniä tai ksyleeniä. (Niskanen 2003, 12.)

Seuraavaksi näyte kyllästetään valuaineella. Parafiini on useimmin käytetty valuaine. Ennen valamista on varmistettava, että kudoksen suurin leikattava pinta on muotin pohjaa kohden. Muotin päälle valutetaan sulaa parafiinia ja sen kanneksi asetetaan kasetti, jossa on näytteen numero. Näyte jäädytetään kylmälevyllä. Kun näyte on jäähtynyt ja kovettunut, se on valmis trimmattavaksi ja leikattavaksi. Ennen leikkausta, irrotetaan parafiiniblokista muotti. (Niskanen 2003, 12.) Ylimääräinen parafiini voidaan poistaa blokkitrimmerillä, joka on kaltevassa kulmassa oleva lämpölevy, joka sulattaa ja kerää parafiinin talteen. (Cellpath. 2018. Block Trimmer).

3.4 Histologisen näytteen leikkaaminen

Histologisten näytteiden leikkaamiseen käytetään mikrotomeja. Mikrotomit ovat leikkauslaitteita, joita käytetään laboratoriotutkimuksen valmisteluissa. Mikrotomi mahdollistaa näytteiden leikkaamisen ohuiksi leikkeiksi, joita voidaan tarkastella mikroskooppilla. (Lusto, Suomen Metsänmuseo. N.d.)

Jäähdytetty blokki kiinnitetään mikrotomiin. Leikkaaminen aloitetaan trimmauksella, jossa mikrotomiin säädetään 15-30 µm leikkuupaksuus. Ennen trimmauksen aloittamista tulee varmistaa, että puristimet, johon kudosplokki on kiinnitetty, on viety perälle, ettei aloittaessa leikkaamista kudosplokki osu terään ja aiheuta vahinkoa kudospälylle. Kun kudosplokkia on trimmattu riittävästi, säädetään leikkuupaksuus 3-4 µm ja aloitetaan leikkaaminen. Tavallisesti käytetään hidasta ja rauhallista leikkaamisnopeutta. Riippuen käytetystä mikrotomista, joko kudosplokki tai terä liikkuu leikatessa. (Bancroft & Gamble, 2008, 93-95.)

Mikrotomeja on eri mallisia ja niiden hankinta määräytyy käyttötarkoituksen mukaisesti. Erilaisia mikrotomeja ovat liukumikrotomi, kelkkamikrotomi, rotaatiomikrotomi ja kiekkomikrotomi. Liukumikrotomissa veitsi liikkuu kiskoilla tai hihnassa ja näyte pysyy paikallaan. Kelkkamikrotomissa veitsi pysyy paikallaan ja näytettä liikutellaan veitsen editse. Kelkkamikrotomit ovat soveltuvia kovienkin näytteiden leikkaamiseen. Rotaatiomikrotomissa myös näyte pysyy paikallaan ja veistä liikutellaan näytteen editse. Rotaatiomikrotomit soveltuvat hyvin sarjaleikkeiden leikkaamiseen. Kiekkomikrotomi on mikroprosessiohjattu, eli leikkausliike saadaan automaattiseksi. (Niskanen 2003, 13.)

Mikrotomeihin on suunniteltu erilaisia veitsiä: metalliveitset, jotka on valmistettu ruostumattomasta teräksestä, kertakäyttöveitset, jotka tarvitsevat myös veitsenpidikkeen, lasiveitset, joita käytetään muovi – ja parafiinitekniikoissa, timanttiveitset, joita käytetään kovakudos – ja elektronimikrotomiassa. (Niskanen 2003, 14). Kertakäyttöterillä voidaan leikata 2-4 µm leikkeitä ja ne ovat päällystetty PTFE:llä (polytetrafluoroeteeni), joka helpottaa näytteen leikkuuta. Terän tulee olla terävä ja virheetön. Mikäli terän kiinnittää teränpitimeen liian tiukasti, voi leikkaamisessa syntyä artefaktoja, kuten liian ohuita tai liian paksuja leikkeitä. (Bancroft & Gamble, 2008, 93-95.) Liian löysästi kiristetty terä aiheuttaa epätasaista jälkeä leikkeeseen. (Niskanen 2003, 16).

Näytteen ollessa liian pehmeä on veden poisto epäonnistunut ja tässä tapauksessa näytteestä on poistettava vesi uudestaan. Näyte on ksyleeninen jos näyte "räjähtää" lämpimässä vesihauteessa suoristuessaan. Tässä tapauksessa parafiinilla kyllästäminen on epäonnistunut ja näyte on valattava uudelleen. (Niskanen 2003, 16-17.)

Leikkausveitsen kulma on päätettävä kudospalan mukaan. Veitsen suurella kaltevuuskulmalla on helpompi leikata, mutta riittävän pieni kulma on välttämätön, jotta kitka vähenisi veistä käytettäessä. Leike voi mennä ruttuun johtuen tylsästä veitsestä tai väärästä kaltevuuskulmasta. Leikattujen leikkeiden oikaisuun tarvitaan kylmä- ja lämminvesihaude. Lämminvesihaude säädetään 45 asteeseen, parafiinin sulamispiste on 56 astetta. (Niskanen 2003, 15.) Molemmat hauteet voidaan täyttää tislattulla tai vesijohtovedellä (Bancroft & Gamble, 2008, 95).

Kylmävesihauteessa leikettä voi vielä suoristaa esimerkiksi pensselin avulla, lämminvesihauteessa leikkeestä suoristuu viimeisimmät rypyt. Leikkeet asetetaan kuivumaan, ja sitten viedään kiinnittymään lämpökaappiin tai lämpölevylle. Lämpökaapille sopiva lämpötila on 37 °C, jossa laseja pidetään yön yli, mutta kiinnitysaikaa voidaan nopeuttaa siirtämällä lasit 60 °C lämpökaappiin 15-20 minuutiksi (Niskanen 2003, 15.) Suorittaessamme patologian harjoittelujaksoa eri patologian laboratorioissa huomasimme, että lämpölevy oli käytetyin näytteen kiinnitystapa.

Mikrotomeihin on mahdollista liittää lisäosa, joka pitää kudusblokin jäähtyneenä ja mahdollistaa pidemmän leikkuuajan blokille. Molemmat rotaatio- ja vesiliukumikrotomi, jota koulussa käytimme, sisälsivät kyseisen lisäosan. Laite sisältää aktiivisesti viilentävän puristimen, joka tarraa kudusblokkiin, pitää sen paikoillaan ja viileänä. (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cool-Cut, n.d.)

3.5 Värjäys

Parafiiniblokeista leikataan halutut leikkeet ja kiinnitetään näytelasille, jonka jälkeen ne värjätään. Hematoksyliini-eosiini-värjäys (HE) on yleisimmin käytössä oleva värjäys Suomessa ja kuuluu perusvärjäyksiin Van Gieson- värjäyksen kanssa. HE-värjäys koostuu kahdesta väriaineesta, joista hematoksyliini värjää tumia ja sytoplasmassa esiintyvää RNA:ta. Eosiini sitoutuu solunsisäisiin ja ulkoisiin proteiineihin esimerkiksi sidekudok-

seen. HE-värjäys säilyy hyvin ja värjää tuman selkeästi, joka on apuna tuma-atypian asetta arvioitaessa. Van Gieson - värjäyksessä kollageeni värjäytyy punaiseksi ja muut kudokset kellanruskeaksi. (Mäkinen, 2012.)

Erikoisvärjäykset ovat yleisesti käytössä munuais-, maksa- ja luuydinbiopsioiden diagnostiikassa. Näitä käytetään varmistamaan perusvärjäyksessä havaittuja löydöksiä tai osoittamaan sellaisia kudskomponentteja, joiden tiedetään näkyvän heikosti käytetyissä perusvärjäyksissä. Yleisimpiä käytössä olevia erikoisvärjäyksiä ovat glukogeenia ja limaa osoittava PAS-värjäys ja tämän kanssa usein käytetty Alcian Blue -limavärjäys. Bakteerien osoitukseen Warthin-Starry värjäys, amyloidikertymien osoitukseen kongo-punavärjäys, haponkestävien sauvojen osoitukseen Ziehl-Neelsen värjäys ja helikobakteerien osoitukseen modifioitu Giemsa-värjäys. (Mäkinen, 2012.)

3.6 Päälystäminen

Kun leikkeet ovat kiinnitetty lasiin ja värjätty, ne suojataan peitinlasilla. Peitinlasi kiinnitetään objektilasiin ksyleeni pohjaisella (esimerkiksi Depex) tai vesiliukoisella (esimerkiksi Aquamount) peitinaineella. Tämän vaiheen voi tehdä joko automaattilla tai käsin. (Niskanen 2003, 16.)

3.7 Jääleikkeet

Jääleikkeitä käytetään, kun näytteen minimaalinen ja nopea käsittely on tarpeen. Kudokset on jäädytettävä nopeasti, kun se on irrotettu verenkierrosta, joten näytteen leikkauspaikka ei voi sijaita kaukana irrottamispaikasta. Eri jäädytysmenetelmiä kudoksille ovat muun muassa nestemäinen tyyppi, isopentaali jäädytettynä nestetyypessä, hiilihappojää, nestemäinen hiilidioksidi. Kudospala jäädytetään leikkausalustalle tai korkinpalan päälle tukiainetta apuna käyttäen. Pala siirretään kryostaattiin tai syväjäähäarkkuun myöhempää vaihetta varten. Kryostaatti eli jääleikemikrotomi, joka on yleisimmin rotaatiomikrotomi ja on sijoitettu jäädytettyyn tilaan. Tilan lämpötilaa voi säätää 0 ja -40 °C välillä. Kaikki mikrotomin säädöt tehdään laitteen ulkopuolelta. Jääleikemikrotomissa käytetään lyhyitä teräsveitsiä. Veitset on puhdistettava ja kuivattava käytön jälkeen, ettei veitset ala ruostumaan. Näytteestä leikataan 1-2 leikettä kahdelle eri objektilasille. Lasien tulee olla käsitelty esimerkiksi gelatiinilla. Lasit fiksoidaan ja huuhdellaan juoksevalla vedellä, jonka jälkeen lasit värjätään. (Niskanen 2003, 20-22.)

4 TOIMINNALLINEN OPINNÄYTETYÖ

Toiminnallinen opinnäytetyö on yksi vaihtoehtoista ammattikorkeakoulun tutkimukselliseksi työlle. Toiminnallinen opinnäytetyö tavoittelee käytännön opastamista, ohjeistamista, toiminnan järjestämistä tai järjeilemistä ammatillisessa kentässä. Toiminnallinen opinnäytetyö voi olla esimerkiksi kirjallinen ohje, perehdytysopas, jonkin tapahtuman järjestäminen tai opetusvideo. Toiminnallisessa opinnäytetyössä on yhdistyttävä käytännön toteutus, raportointi ja kaikki tehdyt vaiheet on kirjattava ylös. Opinnäytetyön tulisi olla käytännöllinen, työelämään soveltuva ja tutkimuksellisella asenteella suoritettu teos. (Vilka & Airaksinen 2003, 9.) Toteutimme oman opinnäytetyömme toiminnallisena opinnäytetyönä. Tämä toteutusmuoto vaikutti mielenkiintoiselta.

Opinnäytetyöpäiväkirja on koko opinnäytetyön prosessin dokumentointia sanallisessa tai kuvallisessa muodossa. Opinnäytetyö on niin laaja kokonaisuus, että päiväkirjan pito on tärkeää, sillä työn lopussa on mahdotonta muistaa kaikkia tekemiään vaiheita, siksi ne kirjataan tekohetkellä ylös. Opinnäytetyöpäiväkirjaan tulee merkata kaikki ideoinnit, kaikki löytämät lähteet ja kirjallisuudet, kuten artikkelit ja kirjat. (Vilka & Airaksinen 2003, 19.)

Laadukkaan opetusvideon tekemisessä tulee ottaa muu muassa seuraavat seikat huomioon: Jalusta, kameran liike, kameran tarkennus, valotus, valkotasapaino, äänentallennus ja videon tallennus. Jalustalla varmistetaan, että kuva ei heilu eikä tuota epätarkkaa kuvaa. Heiluva kuva tekee katselukokemuksesta rasittavan. (Turunen, O. 2010.)

Ennen kuvauksen aloittamista on kuvaajan päätettävä käyttääkö hän kuvauksessa automaatti- vai manuaalitarkennusta. Mikäli kuvaaja ei ole tietoinen käytetystä asetuksesta, voi tuloksena olla epätarkka kuva ja virhe saatetaan huomata vasta editointivaiheessa. Valotuksen kannalta on tärkeämpää huomioida kuvauskohteen valaistus, kuin taustanvalaistus. Valonlähteen ollessa kiinteä on suositeltavaa muuttaa kohteen sijaintia, jotta valonlähteestä saa kaiken hyödyn irti. Valkotasapaino säädetään kamerasta löytyvillä asetuksilla. Tällä taataan luonnolliset värit videolla. Kun valkotasapaino huomioidaan videointi vaiheessa, sitä ei tarvitse murehtia jälkikäteen editoinnissa. Äänentallennuksessa tulee huomioida säröytymisvaara, joka on seurausta liian korkeasta äänitasosta. Myös liian hiljainen äänitys tuottaa ongelmia editointi vaiheessa. (Turunen, O. 2010.)

5 TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULUN MIKROTOMIT

5.1 Liukumikrotomi Sledge Microtome LEITZ 1208

Liukumikrotomissa kudoblokki pysyy paikallaan ja kuljetin liikkuu liukukiskoilla eteen ja taakse. Kuljettimessa on kiinni veitsen pidin, johon asetetaan haluttu kertakäyttöveitsi. Veitsen pidin on kiinnitetty johonkin kolmesta porausreistä, jokaisella reiällä on oma leikkauskulmansa. Ensimmäisellä reiällä leikkauskulma on 90-110°, toisella 90-130° ja kolmannella 120-170°. Useimmin käytetään 90° leikkauskulmaa, jotkut tuoremateriaalit voivat vaatia suuremman kulman. Veitsiä vaihtaessa säädetty kulma säilyy samana. Karkeasäädön avulla näytteen pinta saadaan tasaiseksi leikkaamalla 15-30 µm paksuisia leikkeitä. Pienin mahdollinen leikepaksuus on 1 µm. Mikrotomilla voidaan käyttää automaatiikkaa, jolloin näyte nousee halutun leikepaksuuden verran aina kun kuljetin viedään taakse rajoittimeen asti tai näytteen noston voi suorittaa käsin vivun avulla. Leikkeiden tasaisuuden mahdollistamiseksi leikkeet on leikattava peräkkäin tasaisella nopeudella. Liukuradat on öljyttävä aina laitteen käytön jälkeen ja ennen käyttöönottoa. Mikrotomin liukuradoilla saa käyttää ainoastaan siihen tarkoitettua LEITZ-mikrotomiöljyä. Näytteenpitimen ohjauskiskot on voideltava 3-6 kk:n välein siihen tarkoitettulla LEITX voiteella. (Nilomark LEITZ liukumikrotomi 1208. N.d. Käyttöohje.)



KUVA 1. Liukumikrotomi Sledge Microtome LEITZ 1208 (Kuva: Stålhane 2018)

5.2 Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific Microtom HM340E

Tämä mikrotomi soveltuu edistyneitä parafiini- ja kovaleikkuutekniikoita varten. Mikrotomi pystyy leikkaamaan 0,5 µm- 100 µm paksuisia leikkeitä, trimmauspaksuuden saa asetettua 500 µm paksuuteen asti. Mikrotomissa on "retraction"-toiminto, jonka avulla laite vetää näytettä takaisinpäin jokaisen leikkuun lopussa, toiminto voidaan halutessa kytkeä pois. Mikrotomissa näytteenpidin tekee pystysuuntaista liikettä ja leikkuuterä pysyy paikoillaan. Mikrotomissa on mahdollisuus käyttää moottoroitua karkeasyöttöjärjestelmää, joka mahdollistaa näytteen liikkeen portaattomasti eteen- ja taaksepäin halutuilla nopeuksilla. Ohjauspaneeli sijaitsee laitteen vasemmalla puolella, mistä voidaan säätönappien avulla säätää näytteen karkea (trim) tai hienosyötön (feed) paksuutta. Halutessaan ohjauspaneelin voi irrottaa ja kiinnittää myös mikrotomin oikealle puolelle. Ohjauspaneelin näytöltä on nähtävissä haluttu leikkeen paksuus, leikkeen trimmauspaksuus, leikelaskuri, leikkeiden paksuuksien summa, jäljellä oleva liikematkka etuasemaan, toimintatila, päivämäärä, kellonaika ja leikkuuliikkeen nopeus. Moottoroitu näytteensyöttö vaatii jalkapolkimen, mikä on saatavana lisäosana. Teränpitimet on helppo kiinnittää ja säätää. Mikrotomissa on hätäpysäytysominaisuus leikkaajan turvallisuuden takaamiseksi. Turvallisuutta lisäävät myös sähköinen ja mekaaninen kammien jarru ja sisään painettava kädensija. (Microtom HM340E rotary microtome. 2009. Operation manual.)



KUVA 2. Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific Microtom HM340E (Kuva: Stålhane 2018)

5.3 Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific HM340E ja Microtom STS-vesihaude

STS-vesihaude mikrotomin toimintaperiaatteet ovat samat kuin rotaatiomikrotomissa, mutta mikrotomissa on lisäksi leikkeenkuljetinsilta, lämmitettävä vesiallas ja lämpötilan säätöyksikkö. STS-vesihaude soveltuu siis kaikkien Microtom-rotaatiomikrotomien ja Microtom Ergostar 200:n kanssa käytettäväksi. Veden virtaus tapahtuu pumpun avulla ja virtauksen voimakkuus on säädettävissä. Veden lämpötilaa voi säätää +45 °C asti. (Oriola KD – MICROTOM STS-VESIHAUDE käyttöohje.) Vesiallas voidaan täyttää tislatulla tai vesijohtovedellä (Bancroft & Gamble, 2008, 95). Rotaatiomikrotomin ja vesihauteen yhdistelmää voidaan kutsua vesiliukumikrotomiksi.

Näytteiden leikkaamisen jälkeen parafiinileikkeet liukuvat virtaavan veden mukana vesialtaaseen. Leikkeiden laadun voi arvioida, kun leike on auennut virtaavassa vedessä, tämän jälkeen laaduntarkistus suoritetaan valaistussa lämminvesialtaassa, jonne leike on virran mukana liukunut. Jos leike ei ole laadullisesti hyväksyttävä virtaavassa vedessä, sen voi johtaa virtauksen mukana jätekoriin. Vesiallas, jätekori ja pumppusuodatin ovat helposti irrotettavissa ja puhdistettavissa. Vesiallas tyhjenetään aina käytön jälkeen ja ennen käyttöä lisätään uusi vesi. Vesialtaan saa tyhjenettyä pumpun avulla. (Oriola KD MICROTOM STS-VESIHAUDE. N.d. Käyttöohje.)



KUVA 3. Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific HM340E ja Microtom STS-vesihaude (Kuva: Stålhane 2018)

6 TOTEUTUS JA TUOTOS

Aloitimme opinnäytetyömme tutustumalla laitteisiin, lukemalla laitteiden ohjeita ja tekemällä niiden pohjalta käsikirjoitukset laitteille. Käsikirjoituksia tehdessämme lyhensimme joidenkin mikrotomien osien nimiä niin, että videoista tulisi selkeämpiä. Saimme käsikirjoitukset valmiiksi viikossa. Kukin käsikirjoitus oli sivun tai kahden mittainen. Purimme mikrotomit käsikirjoituksia tehdessä niin pieniin osiin, kuin ohjeiden mukaan oli mahdollista ja näin syvensimme tietotaitoamme laitteisiin, vaikka mikrotomit ovatkin koululla jo tiettyyn vaiheeseen asti kasattuja ennen käyttöä.

Videoimme koevedokset puhelimella. Koevedosten tarkoituksena oli arvioida videoiden pituutta, sekä testata eri kuvakulmia ja valaistusta. Koevedokset saatiin purkkiin yhdellä otoksella, kuitenkin niin, että vaihtelimme kuvakulmia. Hioimme käsikirjoituksia tehdessämme koevedoksia. Päätimme tehdä jälkiäänitykset videoille, jotta videoista tulisi mahdollisimman laadukkaita, ja näin minimoisimme taustahälinän.

Ohjaaja hyväksyi koevedoksemme ja aloimme kuvaamaan varsinaisia opetusvideoita. Kuvaukset suoritettiin Tampereen ammattikorkeakoulun histologian opetustiloissa, missä mikrotomit sijaitsivat. Videoiden kuvaamiseen käytimme kamerana Canon Eos 6D – runkoa ja linssinä Canon EF 24-105mm f/4L IS sekä kolmijalkaa. Kuvattuamme videot varasimme Tampereen ammattikorkeakoulun videostudio tilan, jossa nauhoitimme jälkiäänitykset videoille, jonka tekemiseen varasimme kaksi päivää. Äänityksissä käytimme Zoom H1 –stereotallentinta. Äänitykset jaettiin siten, että Joonas äänitti kaksi, ja Ilja yhden videoista. Äänitykset teimme Tampereen ammattikorkeakoulun videostudio tiloissa, jonka varasimme käyttöömmekahdeksi päiväksi. Äänitettyämme kaiken, videot oli editoitava ja jälkiäänitykset liitettävä videoihin. Ääniraidat käsiteltiin Audacity-sovelluksella ja video ja äänileikkeet kasattiin yhteen Vegas pro 14.0- editointi ohjelmalla. Kirjallisen osuuden tekemisen jätimme viimeiseksi, jonka aloitimme, kun videot ja äänitykset oli saatu päätökseen.

Kuvasimme yhteensä kolme opetusvideota. Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific Microtom HM340E videosta tuli 4 minuuttia 1 sekuntia pitkä. Rotaatiomikrotomi Thermo Scientific HM340E ja Microtom STS-vesihaude videosta tuli 6 minuuttia 40 sekuntia pitkä. Liukumikrotomi Sledge Microtome LEITZ 1208 videosta tuli 4 minuuttia ja 37

sekuntia pitkä. Opetusvideot sisältävät mikrotomien käyttökuntoon laittoon, leikkaamiseen, purkuun ja huoltoon vaadittavat vaiheet.

Videoiden merkittävyys korostuu opiskelijoiden histologian ja patologian kurssien aikana. Videoista on hyötyä, jos haluaa kertailla mikrotomien käyttöä opetustuntien ulkopuolella. Laboratorion harjoitustuntien rajallisen määrän vuoksi videot ovat helppo tapa kerrata mikrotomien toimintaperiaatteita, toimintoja ja käyttöä.

7 POHDINTA

Opinnäytetyötä tehdessä olemme perehtyneet mikrotomeilla työskentelyyn, histologiseen laboratorioprosessiin sekä patologiseen toimintaan laboratoriossa. Opinnäytetyön toteutus oli pitkä ja vaativa prosessi. Videoiden kuvaaminen ja äänittäminen vaati paljon työtä ja kirjallisen osuuden aikaansaaminen oli haastavaa. Opinnäytetyömme aikana kehitimme mikrotomien käyttäjinä ja opetusvideoiden tekijöinä. Kummallakaan meistä ei ollut aiempaa kokemusta opetusvideoiden kuvaamisesta tai tekemisestä. Opetusvideoiden tekemisessä pidimme siitä, että saimme olla luovia videoiden tuottamisessa. Saimme itse suunnitella käsikirjoitukset, ja päättää kuvaus aikataulumme. Testailimme aluksi eri kuvakulmia ja äänenvoimakkuuksia, mikä auttoi jatkoa ajatellen. Näytimme koevedokset vain ohjaajallemme, joka hyväksyi ne, mutta jälkepäin ajateltuna olisi ollut järkevää esitellä niitä myös muille ja näin saada mielipiteitä ja parannusehdotuksia muilta tahoilta kuten luokkalaisilta.

Suurin osa valmiina olevista mikrotomien käyttöohjeista olivat selkeitä, joten käsikirjoitusten tuottaminen sujui jouhevasti. Käsikirjoituksista tuli lyhyet ja selkeä ja ne toimivat videoissa hyvin. Käytimme Tampereen ammattikorkeakoulun mikrotomeja videoillamme. Kuvaus ja äänitys tapahtuivat omilla välineillämme. Valmistimme leikkeet, ja esiinnyimme videoilla itse. Käytimme videoilla omaa ääntämme. Mikrotomeilla työskentelymme pohjautui koululla saamaamme opetukseen ja itsenäiseen perehtymiseen. Tavoitteenamme oli tehdä mahdollisimman selkeät ja tiiviit käsikirjoitukset, että saisimme videon jokaisen opetusvaiheen esitettyä lyhyesti ja ymmärrettävästi. Hankimme editointiohjelman omakustanteisesti ja editoimme videot itse. Emme keskittyneet leikkeen laadukkuuteen lopullisessa videossa, sillä videomme keskittyivät käsittelemään mikrotomien käyttöä, huoltoa ja kasausta.

Otimme kuvausvaiheessa huomioon jalustan käytön kuvan vakauden säilyttämiseksi. Huomasimme kuvatessamme videoita, että nauhoitusnapin painallus aiheutti pienenevän äänen kuvassa ja huomioimme tämän nauhoittamalla kunkin videon alkuun muutaman sekunnin tyhjää, että videoissa olisi editointi varaa ja saisimme siten editoitua kyseisen äänen pois. Tarkennus tapahtui manuaalisesti, jotta se jokaisessa otoksessa olisi juuri haluamassamme kohdassa. Päätimme ennen kuvausten aloittamista, että käytämme jälkiäänitystä, paremman äänenlaadun takaamiseksi. Äänitysten tekeminen ja siirtäminen lo-

pulliseen tuotokseen aiheutti ongelmia, sillä äänitimme jokaista videolla näkyvää työvaihetta kohden oman ääniraidan. Pidimme kuitenkin taukoja äänitysten välillä, joten puheen tahditus kärsi ja äänenvoimakkuus oli vaihtelevaa, jonka vuoksi jouduimme muokkaamaan äänenvoimakkuuksia editointivaiheessa. Lopputulos oli kuitenkin hyvä.

Huomasimme materiaalia läpi käydessä, että muutama ääniraita puuttui nauhoituksista, joten meidän piti käydä uudelleen nauhoittamassa kyseiset repliikit. Uusien ääniraitojen nauhoitukset eivät miellyttäneet laadultaan, vaikka käytimme samoja välineitä ja tilaa, emme saaneet ääniraidoista yhtenäisiä alkuperäisten raitojen kanssa. Jouduimme kuitenkin käyttämään näitä videoissa. Valotus oli täysin riippuvainen opetustilassa olevasta valaistuksesta, koimme tämän kuitenkin riittäväksi. Siirtelimme laitteita mahdollistaaksemme parhaan valaistuksen ja taustan videon tekemiselle. Emme huomioineet valkotasapainoa videointia suorittaessa ja tämän seurauksena editointiin jouduttiin käyttämään enemmän aikaa kuin oli suunniteltu.

Patologian harjoittelujakso oli meillä videoiden kuvausten jälkeen. Kehityimme mikrotomien käsittelyssä harjoittelujakson aikana huomattavasti. Mikäli videot olisi kuvattu myöhemmin, olisi kudosleikkeistä saatu mahdollisesti parempi laatuja ja videoihin olisi voinut lisätä hyviä ohjeita leikkuuseen liittyen, esimerkiksi leikkeen suorittamisen helpottamiseksi leikkuvaiheessa leikkeeseen voi puhalttaa leikkeen suoristumisen helpottamiseksi.

Videoiden merkittävyys korostuu opiskelijoiden histologian ja patologian kurssien aikana. Videoista on hyötyä, jos haluaa kerrata mikrotomien käyttöä opetustuntien ulkopuolella. Laboratorion harjoitustuntien rajallisen määrän vuoksi videot ovat helppo tapa kerrata mikrotomien toimintaperiaatteita, toimintoja ja käyttöä.

Kirjallisen osuuden tuottaminen oli haastavaa, sillä lähteet olivat rajallisia. Mikrotomeista ei löydy suuria määriä kirjallisuutta ja tämä vaikutti huomattavasti muun muassa lähteiden määrään. Jatkoa ajatellen tekisimme videon, joka kohdistuisi pelkästään kudosblokin leikkaamiseen ja laadukkaiden leikkeiden aikaansaamiseen. Tämä voisi olla hyvä opinäytetyöaihe tuleville opiskelijoille, sillä mikrotomeilla leikkaaminen ja laadukkaan leikkeen saaminen ovat tärkeä taito patologian laboratoriossa. Tasainen ja rypyttömä leike takaa hyvän värjäyksen ja luotettavan mikroskooppisen tarkastelun.

LÄHTEET

Bancroft, J. Gamble, M. 2008. Theory and Practice of Histological Techniques sixth edition, 56.

Bancroft, J. Gamble, M. 2008. Theory and Practice of Histological Techniques sixth edition, 93-94.

Cellpath, 2018. Block Trimmer. [viitattu 10.6.2018]. Saatavissa: (<https://www.cellpath.com/block-trimmer-no-tilt-110-230v-a-c-50-60hz-jaz-0100-00a.html>)

HUS, kudos- ja solunäytteet. N.d. [viitattu 15.4.2018]. Saatavissa: <http://www.hus.fi/hus-tietoa/sairaanhoitoalueet/hyks/huslab/laboratorion-erikoisalat/patologia/kudos-ja-solunaytteet/Sivut/default.aspx>

Lusto, Suomen metsämuseo, mikrotomi. N.d. [viitattu 1.8.2018]. Saatavissa: <https://www.finna.fi/Record/lusto.M011-388543>

Mäkinen, M. Lehto, V. 2012. Patologian kaksoisluonne ja integratiivinen lääketiede.

Mäkinen, M. 2012. Patologia, E-kirja.

Naukkarinen, A. 2003 Histologiset menetelmät. 7. painos. Luentomoniste, 7-9.

Naukkarinen, A. 2003. Histologiset menetelmät 7. painos. Luentomoniste 11-12.

Nilomark LEITZ liukumikrotomi 1208. N.d. Käyttöohje.

Niskanen, M. 2003. Histologiset menetelmät 7. painos. Luentomoniste 10.

Niskanen, M. 2003. Histologiset menetelmät 7. painos. Luentomoniste 14-17.

Niskanen, M. 2003. Histologiset menetelmät 7. painos. Luentomoniste 20-22.

Oriola KD MICROTOM STS-VESIHAUDE. N.d. Käyttöohje

Ross, M. Pawlina, W. 2005. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 5th ed.

Rudbeck, L. Taylor, R. 2013. Dako Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. 6th ed.

Suomen bioanalyttikko ry, kliininen histologia ja sytologia. N.d. [viitattu 5.5.2018]. Saatavissa: <https://www.bioanalyttikkoliitto.fi/mika-ihmeen-bioanalyttikko/bioanalyttikon-koulutus/erikoisalat/kliininen-histologia-ja-sytologi/>

Thermo Fisher Scientific Microm HM340E rotatory microtome. Operation manual. 2009.

Thermo Fisher Scientific. N.d. Tuotteet, Cool-cut. [Luettu 6.8.2018]. Saatavissa:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/771110>

Turunen, O. 2010. Digikuvausopas. [viitattu 8.8.2018]. Saatavissa:
<https://www.digikuvaus.fi/digikuvausopas/kuvaa-kamerallasi-parempia-videoita-10-ohjetta-videokuvaukseen/>

Vilka, H. Airaksinen, T. 2003 Toiminnallinen opinnäytetyö. Kustannusosakeyhtiö Tammi, 9, 11.