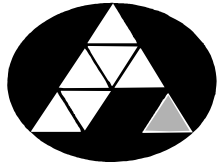


POHJOIS-KARJALAN AMMATTIKORKEAKOULU
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Olli-Pekka Karhu

LÄMPÖTILAN VAIKUTUS LUUYDINNÄYTTEIDEN DEKALSIFIOINNIN
NOPEUTTAMISEKSI

Opinnäytetyö
Marraskuu 2011



POHJOIS-KARJALAN
AMMATIKORKEAKOULU

OPINNÄYTETYÖ
Marraskuu 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tikkarinne 9
80200 JOENSUU
p. (013) 260 600

Tekijä
Olli-Pekka Karhu

Nimeke
Lämpötilan vaikutus luuydinnäytteiden dekalsifioinnin nopeuttamiseksi

Toimeksiantaja
Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä (PKSSK)

Tiivistelmä

Dekalsifointi on prosessi, jossa kovasta luuydinnäytteestä tehdään pehmeä. Tässä opinnäytetyössä tutkittiin lämpötilan vaikutusta luuydinnäytteiden pehmittämisen eli dekalsifioinnin nopeuteen. Tarkoituksena oli luoda Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä sopiva näytteidenkäsittelymenetelmä luuydinnäytteiden dekalsifointiin. Tutkimus oli tärkeä, sillä sen avulla luuydinnäytteiden dekalsifointi nopeutui kolmesta päivästä 90 minuuttiin. Tämän ansioista potilaiden hoitokäytäntö nopeutuu.

Tutkimustyyppinä käytettiin toiminnallista tutkimusta, yhdistelemällä kvantitatiivisia piirteitä. Tästä johtuen tutkimustyyppiksi muodostui useiden menetelmien yhdistäminen. Työ suoritettiin kolmen päivän aikana kliinisen patologian laboratoriossa Joensuussa. Tutkimuksen avulla pyrittiin löytämään Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä sopiva mikroaaltouunin lämpötila, minkä avulla dekalsifointi nopeutuisi. Lisäksi selvitettiin, onko luuydinnäytteiden diagnosointi mahdollista, kun luuydinnäytteet dekalsifoidaan kyseisellä menetelmällä.

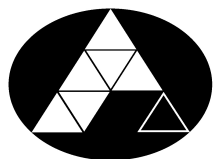
Tutkimustulosten mukaan 50°C:n lämpötila on Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä sopivin dekalsifointilämpötila. Lisäksi todettiin, että näytteiden diagnosointi on mahdollista, kun luuydinnäytteitä dekalsifoidaan 90 minuuttia mikroaaltouunissa 50°C:n lämpötilassa. Jatkotutkimuksen avulla tuota lämpötilaa voisi vielä tarkentaa.

Kieli
suomi

Sivuja 35
Liitteet 11
Liitesivumäärä 30

Asiasanat
luuydin, dekalsifointi, EDTA

Abstract



NORTH KARELIA
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

THESIS
November 2011
Bachelor of Biomedical Science
Tikkarinne 9
FIN 80200 JOENSUU
FINLAND
Tel. 013 260 600

Author
Olli-Pekka Karhu

Title
Effect of heat for bone marrow during decalcification to aim faster decalcification period

Commissioned by North-Karelia central hospital, the laboratory of clinical pathology

The purpose of this study was to investigate the effect of heat for bone marrow during decalcification process. Main focus was to aim faster decalcification period, for diagnostic purposes. The study was for North-Karelia central hospital, the laboratory of clinical pathology. New research method can take place along with the research results.

Language
Finnish

Pages 35
Appendices 11
Pages of Appendices 30

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1	JOHDANTO.....
2	LUUYDIN- JA KOVAKUDOSNÄYTE.....
2.1	Luuydinnäyte.....
2.2	Kovakudosnäyte.....
2.3	Solut.....
3	HISTOLOGISEN NÄYTTEEN KÄSITTELY.....
3.1	Fiksaatio.....
3.2	Luun pehmittäminen.....
3.3	Lämpökäsittely.....
3.4	Kudosprosessointi.....
3.5	Valu ja mikrotomia.....
3.6	Värjäys.....
3.6.1	Hematoksyliini-eosiini-värjäys.....
3.6.2	PAS-värjäys.....
3.6.3	Giemsa-värjäys.....
3.6.4	Gomorrin retikelivärjäys.....
3.6.5	Leder-värjäys.....
3.7	Näytteen diagnosointi.....
4	TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....
5	TUTKIMUSMENETELMÄT.....
5.1	Tutkimusympäristö.....
5.2	Aineiston hankinta.....
5.3	Aineiston käsittely.....
5.4	Tutkimuksen suoritus.....
6	TULOKSET.....
7	POHDINTA.....
7.1	Luotettavuus ja eettisyys.....
7.2	Tulosten tulkinta ja johtopäätökset.....
7.3	Jatkotutkimusaiheet.....
	LÄHTEET.....

LIITTEET

Liite 1	Hematoksyliini-eosiini-värjäysohje
Liite 2	PAS-värjäysohje
Liite 3	Giemsa-värjäysohje
Liite 4	Gomorrin retikelivärjäysohje
Liite 5	Leder-värjäysohje
Liite 6	Leikkautumisen arviointilomake
Liite 7	Värjäytymisen arviointilomake
Liite 8	Validointilomake
Liite 9	Leikkautumisen ja värjäytymisen arviointitulokset
Liite 10	Tutkimuslupahakemus
Liite 11	Toimeksiantosopimus

1 JOHDANTO

Luuydinbiopsian käyttö potilaan diagnoosissa on viime aikoina laajentunut teknologian kehittymisen vuoksi suuresti. Luuydinbiopsiasta saadaan luotettavaa tietoa hematologisten tautien tutkimisessa ja seurannassa. Aikaisemmin tärkein tutkimusmenetelmä elimistön luuytimen komponenttien tutkimiseen oli aspiraationäyte, mutta luuydinbiopsia on kasvamassa yhtä tärkeäksi menetelmäksi. Perinteisempi aspiraationäyte, eli luuytimen solumassasta otettava näyte kulkee edelleen diagnoosin tukena ja hoidon seurannassa. Nykyisin nämä näytteet otetaan monesti yhdessä, jolloin elimistön tilan arviointi on entistä luotettavampaa. (Vornanen 2007, 199.)

Kun näytemateriaalina käytetään dekalsifioitua luuydinnäytettä, joka on valettu parafiiniin, siitä pystytään nykyisin suorittamaan sytogeneettisiä, syövän osoittamiseen käytettäviä, tutkimuksia. Ennen tämä oli mahdotonta. Tätä samaa materiaalia pystytään hyödyntämään myös lymfosyyttien klonaliteetin määrittämiseen, eli kuinka solujakautuminen näkyy näytteessä verrattuna potilaan kliiniseen tilaan. Ihanteellista olisi, että nopeakasvuissa sekä pahanlaatuisissa taudissa, tai hoitovasteen arvioinnissa olisi käytössä pikaprosessointimenetelmä, jolla leikkeiden valmistus voitaisiin lyhentää radikaalisti, jopa yhteen tai kahteen, vuorokauteen. (Vornanen 2007, 199.) Nopeakasvuisten pahanlaatuisten veritautien käsittelyyn tulisi olla pikamenetelmä (Siitonen & Jansson 2007, 106 - 107). Nykyisin laboratorio voi kuluttaa aikaa tähän jopa usean viikon.

Dekalsifointia käytetään luuydinnäytteiden kalsiumsuolojen hajottamiseen. Dekalsifointiin voidaan käyttää useita kemiallisia yhdisteitä, kuten etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA), rautakloridiliuosta tai Decalc-liuosta. Dekalsifoinnissa kovakudosnäytteen kalsiumsuolat hajotetaan, jotta näyte pehmenisi patologian laboratoriotoininnan kannalta prosessoitavalle tasolle, muun muassa näytteen leikkaus mahdollistuu. EDTA-menetelmä on kemiallisista pehennysmenetelmistä kliinisesti ensisijainen, sillä näytteen diagnosoitavuus säilyy korkealla tasolla. Tämä johtuu siitä, että näytteen muut komponentit hajoavat vähän, tai eivät ollenkaan, mikä vaikuttaa edelleen

näytteen prosessointiin ja lopulta patologin antamaan patologis-anatomiseen diagnoosiin (PAD). (Bancroft & Gamble 2008, 339.) Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli luoda Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä (PKSSK) sopiva menetelmä kovakudosnäytteiden prosessoinnin nopeuttamiseksi mikroaaltouunitekniikan avulla.

2 LUUYDIN- JA KOVAKUDOSNÄYTE

2.1 Luuydinnäyte

Useimpien luurangon luiden sisällä on luuydintä. Luuydin on ontelo, jonka rakenne on sienimäisen luukudoksen täyttämä tila. Luuytimen läpi kulkee runsaasti verisuonia sekä luutiehyitä, jotka yhdistävät ydinontelon muihin luun osiin. Luuytimessä muodostuu tärkeä osa elimistön verisoluista. (Pakkanen, Kangasniemi & Opas 1980, 169.)

Nykyisin luuydinbiopsia suoritetaan lääkärin vastaanotolla kertakäyttöisillä neulatyypisillä instrumenteilla. Kohteena luuydinnäytettä otettaessa on yleensä suoliluun harjanne. Toimenpide saattaa olla potilaalle kivuliaskin, minkä vuoksi paikallispuudutuksen lisäksi voidaan käyttää myös esilääkitystä. Luuydinbiopsian otto suoritetaan aseptisissä oloissa. (Ruutu, Rajamäki, Lassila & Porkka 2007, 106.)

Tietyissä tilanteissa luuydinbiopsia, eli pala luuydinkudosta, on aspiraationäytteeseen verrattuna ylivoimainen. Näytettä tilattaessa on otettava huomioon tutkittava kohde. Mikäli halutaan tutkia luuytimen solumäärää, biopsia on silloin käyttökelpoisempi vaihtoehto kuin aspiraatti, joka antaa usein hyvin vaihtelevia tuloksia. Toisaalta vaikea trombosytopenia, eli trombosyyttien vähyys, estää luuydinbiopsian oton. (Ruutu ym. 2007, 106 - 107.)

Aspiraationäyte otetaan yleensä luuydinbiopsian yhteydessä. Tästä näytteestä tutkitaan veren koostumus hematologian laboratoriossa lasipreparaatille tehtävällä sivelyvalmisteella. Aspiraationäytettä otettaessa täytyy varoa, ettei luuydinbiopsian histologinen rakenne kärsi, kuten Ruudun mukaan noin 10%:ssa tapauksista näyttää käyvän. Luuydinbiopsian onnistumisen

takaamiseksi luuydinbiopsianäyte otetaan ennen aspiraattia. Toisaalta aspiraatin onnistumiseksi, näytteenottoneula suunnataan eri kohtaan luuydintä ennen aspirointia. Tekniikka on vaikea, ja vasta pitkän harjoittelun jälkeen päästään tilanteeseen, jossa epäonnistuneiden luuydinbiopsia-valmisteiden osuus on alle 10 prosenttia näytteistä. Onnistuneeseen näytteenottoon kuuluu sekä näytteenotto, että mikroskopointi. (Ruutu ym. 2007, 106 -108.)

Aspiraationäytteenotto on joissain tapauksissa kyseenalainen. Esimerkiksi Non-Hodgkin-lymfooman (NHL) levinneisyystutkimuksissa negatiivisista aspiraationäytteistä joka neljäs tai viiden on kuitenkin histologisesti positiivinen. NHL:ssa tutkimus tulisiikin tehdä vain erikoistapauksissa harkitusti. (Ruutu ym. 2007, 106 - 107.)

2.2 Kovakudosnäyte

Kovakudosnäytteellä tarkoitetaan patologian laboratorioon saapuvaa näytettä, joka on kudostyypiltään luuta. Laboratorioon saapuva kovakudosnäyte voi olla kooltaan hyvinkin vaihteleva. Näyte voi olla muutaman millimetrin mittainen luun pala, kokonainen raaja tai neulalla kudoksesta otettu koepala, i. luuydinbiopsia. (Bancroft & Gamble 2008, 335.)

Aikuisen ihmisen luurangosta voidaan makroskooppisesti havaita kahta luutyyppeä: 1) pitkää luuta, joka toimii vipuna, kuten reisiluu tai sääriluu, 2) litteää luuta, jota esiintyy elimiä suojaavana panssarina, esimerkiksi kylkiluu, tai kallon luut. (Bancroft & Gamble 2008, 333.) Luu on kokonaisuus, joka sisältää vettä, soluja, sekä proteiineja (orgaaninen materiaalia) ja epäorgaanisia mineraaleja. Painoltaan luu jakautuu siten, että keskimääri 8 % luusta on soluja, 25 % pintamateriaalia, ja mineraaleja on noin 67 %. Tilavuudeltaan mineraaleja on 40 - 45 % ja orgaanista materiaalia 35 - 40 %. (An & Martin 2003, 39.) On tärkeää muistaa, että luu on ominaisuudeltaan huokoista materiaalia, joten luuta pehmitettäessä prosessiin käytettävää vähimmäisaikaa ei voida tilavuuden suhteen määrittää tarkasti etukäteen.

Luuta esiintyy usealla elimistön tasolla, ja sen rakenne yhdistää ihmisen solutasolta kolmiulotteiseen muotoonsa. Luukudos voidaan jakaa kolmeen

rakennetasoon: 1) soluihin, 2) veteen sitoutuneeseen solunulkoiseen elävään tasoon ja 3) solunulkoiseen mineraaleja sisältävään tasoon. (An & Martin 2003, 35.)

2.3 Solut

Luukudoksesta on löydetty neljää erilaista solutyyppeä, jotka sijaitsevat eri tasoilla. Ominaisen tasonsa mukaan ne kuvastavat tehtäväänsä. (An & Martin 2003, 35.)

Osteoblastit muodostavat luuta. Ne ovat yksitumaisia soluja, jotka ovat muodostuneet alkeissidekudoksesta, alkion mesodermistä, sisältäen runsaasti alkalisia fosfaatteja. Aktiiviset solut ovat muodoltaan neliönmuotoisia tai monitahoisia. Ne sisältävät runsaasti karkeaa solulimakalvostoa (rER) sekä Golgin laitteita. Osteoblastit kypsyvät preosteoblasteista, joiden morfologinen yhteneväisyys osteoblasteihin on suuri, mutta niiltä uupuvat kypsien osteoblastien antigeenit. Osteoblasteja esiintyy rinnakkaina luun pinnassa, paikoissa, joissa luun muodostus on aktiivista. Luunmuodostus ulottuu 5 – 50 µm:n osteoblastin pinnasta, mikä 10 – 20 %:lla osteoblasteista merkitsee luukudokseen hautautumista. Luunmuodostuksen lisäksi osteoblastit muodostavat kollageenaasia, jota käytetään luun hajotuksessa, mineraalien takaisinotossa elimistöön. (Salo 2002, 18.)

Osteosyytit ovat yksitumaisia, kypsiä soluja, jotka ovat järjestäytyneet osteoneiksi. (Solunetti 2010). Niiden useat pitkät kanavat ulottuvat luun sisään. (Salo 2002, 18). Kalkkeutunut luumatriisi estää aineenvaihdunnan luumateriaalin läpi, joten kanavat mahdollistavat ravinteiden ja hapen kulkeutumisen osteosyyttien, kuten myös osteoblastien välillä. Lisäksi ne ovat yhteydessä luun pinnoitteeseen. Osteosyytit ovat osteoblasteihin nähden pienempiä. Niiden on ajateltu olevan osteoblasteja, jotka ovat jääneet muodostuneen luumassan sisään. (Salo 2002, 18.) Osteosyytit muodostavat yksittäisen haversin kanavan, joka sisältää verisuonia ja hermoja. Osteosyytit muodostavat uutta luuta lukuunsa seinämään, hoitaen näin luukudosta. (Solunetti 2010).

Monitumaiset suuret osteoklastit vastaavat luun mineraalien takaisin otosta elimistön käyttöön. Ne ovat hematopoijeettiselta alkuperältään muodostuneet yksitumaisten progenitorisolujen - monosyyttien ja makrofagien - yhteensulautumisena. Osteoklastit vapauttavat mineraaleja luusta järjestelmällisesti vaihe vaiheelta. Tähän kuuluu epäkypsien osteoklastien lisääntyminen, yhteys luun pintaan sekä protonien ja hydrolyyttien erottelu, mikä erottaa epäorgaanisen materiaalin orgaanisesta. Osteoklastien toimintaa ohjailevat lukuisat välittäjäaineet, kuten interleukiinit (IL) 1, 6 ja 11, kuten myös välittäjäaineet TGF- α (muuntava kasvutekijä) sekä TNF (tuumori nekroosi tekijä). (An & Martin 2003, 38.)

Luun pinnalla sijaitsevat pitkäjaksoiset pintasolut ovat neljäs luusolutyyppi. Luukudos, joka ei ole aktiivisessa tilassa muiden luustosolujen toiminnan osalta koostuu pintasoluista. Pintasolujen oletetaan olevan joko aktivoitumattomia osteoblasteja, jotka tarvittaessa voivat aktivoitua tuottamaan luuta, tai jakautumaan kykeneviä soluja. (Salo 2002, 19.)

Painoltaan 90 % luun ulkoisen tilan, matriksin, soluista on proteiineista muodostunutta kollageenia. Pääkomponentti on kollageeni tyyppi I, mutta myös muita tyyppisiä on löydetty (tyypit III, V, XI, XIII). (Salo 2002, 16.) Loput 10 % ei-kollageenista materiaalista koostuu proteoglykaanista, g-karboksyylaatti (gla) -proteiinista, glykoproteiinista sekä muusta materiaalista, kuten kasvua stimuloivasta proteiinista. (Salo 2002, 16.)

Luu on elimistön mineraalivarasto. Elimistön kalsiumista 99 % ja elimistön fosfaateista 88 % on varastoitunut luuhun. Epäorgaaninen luumatriksi koostuu pääosin laatta tai pilarimallisista kalsiumkarbonaatti- ja kalsiumfosfaattikiteistä, joita kutsutaan hydroksiapatiitiksi. Kiderakenne mahdollistaa kudoksen laaja-alaisen metabolian, jopa 10m² alueella 1 luugrammaa kohti. Muita solunulkoisia mineraaleja ovat kalsiumkarbonaatti, kalsiumfluoridi ja magnesiumfluoridi. (Salo 2002, 17.)

3 HISTOLOGISEN NÄYTTEEN KÄSITTELY

3.1 Fiksaatio

Fiksaation eli kiinnityksen tehtävä on estää autolyysi eli kudoksen omien entsyymien ja bakteerien aiheuttama kudoksen hajoaminen. Fiksaation seurauksena myös kudoksen jatkokäsittely helpottuu, sillä kudoksesta tulee kiinteä, toisin sanoen, se säilyttää luonnollisen fysiologisen muotonsa. Fiksaatiosta vastaa kudoksenäytteenotossa lääkärin apuna oleva hoitaja, joka myös toimittaa näytteen fiksaatioliuoksessa patologian laboratorioon. (Aho 1994, 6.) Kuvassa 1 esitetään laboratorioon toimitettavia näytteitä fiksaatioliuoksessa.



Kuva 1. Näytteitä fiksaatioliuoksessa (Karhu, 2011).

Fiksaatioaine on vesipohjainen liuos, joka aikaansaa kudoksen kiinteyden muodostamalla kudoksen valkuaisaineiden, proteiinien väliin poikkisidoksia, mikä aiheuttaa kudoksen geelimäisen rakenteen. Näin kudoksen komponentit pysyvät liikkumattomina toisiinsa nähden, ja kudoksen muoto säilyy ottohetkellä vallitsevassa muodossaan. (Aho 1994, 6.)

Kovakudoksenäytteiden fiksaatioon käytetään yleensä liuosta, jota kutsutaan formaliiniksi. Se sisältää 4 % formaldehydiä (HCHO), mikä on väritön kaasu. Vesiliuoksessa formaldehydi on normaalisti monohydraattina (eli se liukenee veteen). Formaldehydin monohydraattimuoto on metyleeniglykoli ($\text{CH}_2(\text{OH})_2$). Tämän lisäksi vesiliuos sisältää monomeerista formaldehydiä, joka on yksiosainen pienimolekyylinen metyleeniglykolin rinnalla. Formaldehydin metyleeniglykolimuoto on hyvin kudoksiin tunkeutuva, mutta formaldehydin monomeerimuoto vastaa varsinaisesta fiksaatiosta. Puhdasta formaldehydifiksaatiivia saadaan paraformaldehydijauheesta. (Aho 1994, 8.)

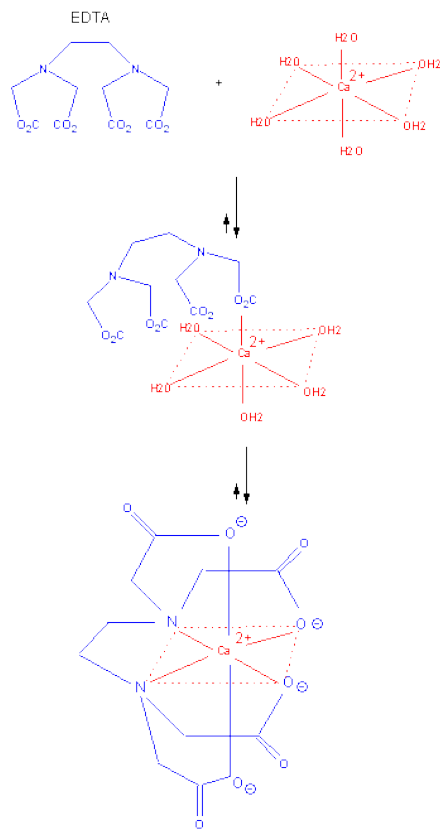
Luuytimen fiksaatio ennen dekalsifointia on todella tärkeä. Täydellinen fiksaatio auttaa suojelemaan näytekudosta dekalsifoinnissa käytettävien happojen tuhoisalta vaikutukselta. Fiksaation nopeuttamiseksi luuydinnäytettä on mahdollisuuksien mukaan leikattava pienemmiksi paloiksi, sekä luuydintä ympäröivää hohkaluuta poistettava. (Bancroft & Gamble 2008, 336.)

3.2 Luun pehmittäminen

Luuydinnäytteen käsittely on ongelmallista, sillä näytteen rakenne on kovaa sen sisältämien kalsiumsuolojen (Ca^{2+}) vuoksi. Tämän vuoksi kalsiumsuolat, jotka ovat metalli-ioneja, on kelatoitava. Kelaatiossa kalsiumsuolat muodostavat yhteisiä komplekseja, jolloin muodostuu saoste, kelaatti. (Mortimer & Hakkarainen 2001, 236 – 237.) Tällöin luusta poistuu kalsium sakkana ympäröivään liuokseen, ja kudoksenäytteestä tulee pehmeä. Vahvoissa hapoissa, kuten typpi- tai suolahappo, kalsiumionit poistuvat nopeasti, mutta muutaman tunnin käsittelyn jälkeen kudoksen solurakenne vaurioituu, ja kudoksen värjäytyvyys muuttuu. Tällöin kudoksen diagnostinen arvo heikkenee. (Aho 1994, 11.)

EDTA ei kykene sitomaan kalsiumia pH:n ollessa 3 tai alle. Optimaalinen sitoutuminen tapahtuu pH:n ylittäessä 8, mutta tällöin happamuus voi vahingoittaa proteiinisisidoksia. Tästä johtuen EDTA-liuoksesta kannattaa tehdä neutraali, jolloin liuoksen pH on väliltä pH 7-7.4. (Bancroft & Gamble 2008, 339.)

EDTA-liuoksella saadaan aikaan dekalsifointi, joka ei vaurioita solurakennetta lainkaan (Aho 1994, 11). Tällöin kudoksen tarkastelusta voidaan havaita todelliset, kliiniset poikkeavuudet. EDTA:n käyttö on yleistä näytteiden käsittelyssä, sillä se kykenee muodostamaan kalsium-ionin kanssa komplekseja, jotka ovat hyvin pysyviä. Kalsium-ionilla on hyvin vähäinen taipumus muodostaa komplekseja tavallisesti, mutta EDTA-liuos tarjoaa käyttökelpoisen työvälineen kalsium-ioneja kelatoidessa. (Mortimer & Hakkarainen 2001, 237.) Kuvassa 2 esitetään EDTA :n ja kalsium-ionin muodostama kelaatti.



Kuva 2. EDTA:n ja kalsium-ionin muodostama kelaatti (Jakubowski 2011).

3.3 Lämpökäsittely

Lämpökäsittely on yksi tapa luuydinnäytteen pehmenemisen nopeuttamiseksi. Menetelmä perustuu molekyyllitason liikkeisiin, mikä aiheuttaa näytteen sidosten aukeamisen, ja tätä kautta näytemateriaali pehmenee. (Saranen 2005, 36.) Tutkimuksessa lämpökäsittely suoritettiin kliiniseen käyttöön tarkoitetulla mikroaaltouunilla.

Mikroaaltoja, jotka ovat elektromagneettisia aaltoja, säätelee sähköinen ja magneettinen kenttä. Niiden avulla luotu säteily aiheuttaa lämpenemisen. Molekyylien heilahduksista johtuvaa lämpenemistä käytetään parantamaan kudoksen fiksaatiota. Tällöin mikroaallot siis nopeuttavat diffuusiota kudokseen ja kudoksesta ulos vahingoittamatta kudismorfologiaa. Tämä johtuu siitä, että mikroaaltoenergia ei ole tarpeeksi vahvaa rikkoakseen kovalenttisia sidoksia tai vetysidoksia. (Saranen 2005, 36.)

Vaihtovirtakentän tuottamat mikroaallot ohjataan jatkuvana virtana

aallonohjaimen kautta näytekammioon, joka on suojattu metallilla. Metallilla suojaaminen estää säteiden poistumisen kammioista. Ainoastaan pienimmät näkyvän valon säteet, joiden aallonpituus on nanometrinen luokkaa, pääsevät poistumaan kammioista. Pienemmät mikroaallot jäävät kammion sisään. Lopulta kammion sisälle syntyy alueita, joissa on suurempi ja pienempi mikroaalloenergia, eli kuumia ja kylmiä kohtia. Kuumien ja kylmien kohtien eroa pyritään välttämään kahdella tavalla: joko liikuttelemalla näytettä tai sekoittamalla. Laboratoriokäytännössä olisi suositeltavaa käyttää laitetta, joka sisältää aallonsekoittajan. (Saranen 2005, 36.)

3.4 Kudosprosessointi

Pehmittämisen jälkeen luuydinäytteet käyvät läpi prosessin, jossa tapahtuvat vedenpoisto, kirkastus, imeytys, sekä valu. Jokaisen vaiheen toteuttaa määrätty liuos ja tarkkaan valittu käsittelyaika. (Bancroft & Gamble 2008, 83 - 84.) Kuvassa 3 esitetään kudosprosessointiautomaatti. Kudosprosessointi suoritetaan automaattisesti kudosprosessiautomaatilla.



Kuva 3. Kudosprosessiautomaatti (Karhu 2011).

Nousevaa alkoholisarjaa käytetään vedenpoistoon. Vedenpoiston tarkoitus on poistaa kudoksenäytteestä vesi sekä kiinnitysliuos, fiksatiivi. Kirkastus on vaihe, jossa poistetaan vedenpoistoon käytettävä alkoholi. Tässä käytetään usein ksyleeniä. Ksyleenikäsittely valmistaa kudoksenäytteen myös seuraavaan vaiheeseen, imeytykseen. Imeytyksessä kudoksenäytteestä tehdään vastaanottavainen viimeisen vaiheen, valun, liuokselle. Valussa kudoksenäyte tuetaan materiaalilla, joka aikaansaa kudoksen kovettumisen. Tukimateriaalina

käytetään parafiinia. (Bancroft & Gamble 2008, 84.)

3.5 Valu ja mikrotomia

Ennen kudoksen leikkaamista suoritetaan kudoksen (lisä)valu parafiiniin. Parafiini on pehmeähköä ainetta, joka tukee kudoksenäytettä leikkauksen aikana. Näytteen tulee olla riittävän pehmeä, että parafiini voi tukea näytettä leikkattaessa. (Aho 1994, 11.)

Valussa kudoksenäyte vuorataan vahamaisella, värittömällä, hajuttomalla parafiiniöljyllä, joka on käsin kosketeltuna kuin kynttilän steariinia. Parafiiniseos on pitkä hiili-vetyketju, joka kuumennettaessa sulaa juoksevaksi. Parafiinin ominaisuuksia käytetään hyödyksi valussa. Korkeassa lämpötilassa sulava parafiini on usein kovempaa kuin alhaisemmassa lämpötilassa sulava. Parafiini sulaa välillä 40 °C – 70 °C. (Bancroft & Gamble 2008, 87.) Kuvassa 4 on esitetty parafiinivalussa käytettävä taso, joka sisältää kuuma- sekä kylmätasot.



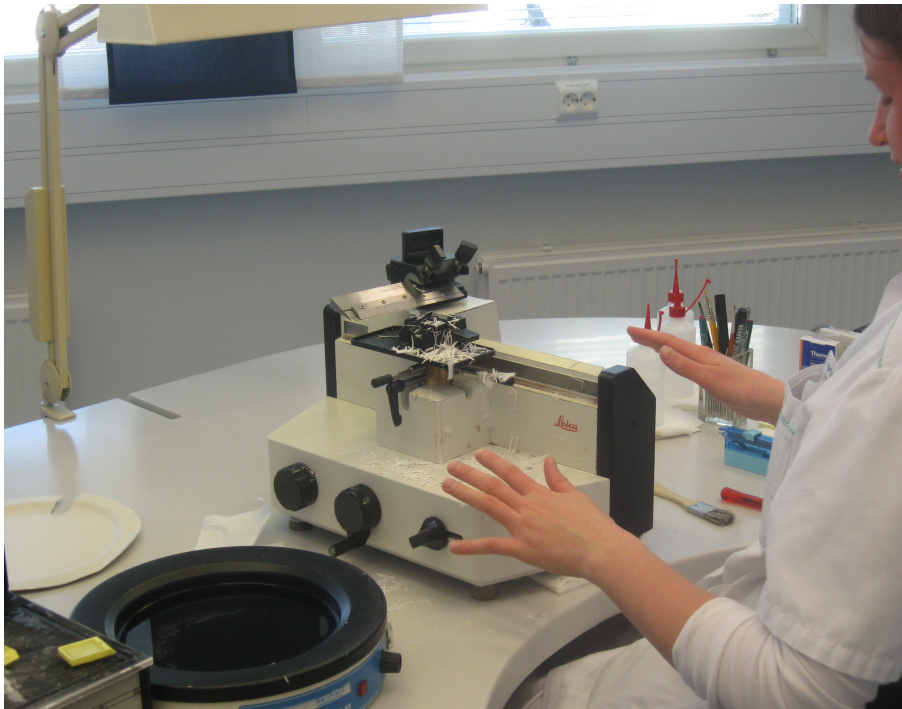
Kuva 4. Parafiinivalutaso (Karhu 2011).

Kudosprosessoinnin lopussa käytetyn parafiinin ja valussa käytetyn parafiinin välillä on yhteys. Kudoksenäytteen tulee olla tuettu parafiiniin täydellisesti, jotta

leikkaus onnistuisi. Valussa parafiinilla tuetaan kudoksenäyte enää vain muottiin, joka koteloidaan leikkauksessa käytettävän mikrotomin istukkaan leikkauksen ajaksi. Mikrotomin terä kulkee kudoksenäytteen päältä vertikaalitasossa, siivilöiden kudoksenäyte-parafiinimuotista ohuita, noin 2-5 µm:n paksuisia leikkeitä. Kudosten prosessoinnin tuleekin olla valun osalta onnistunut, jotta parafiini peittää kudoksen kokonaan. Tämä tekee kudoksenäytteestä homogeenisen, jolloin leikattaessa, kudoksenäyte koostuu fysikaalisesti vain yhdentasoisesta tiheydestä. (Bancroft & Gamble 2008, 96.)

Mikäli kudoksenäyte hajoilee leikatessa, voi tutkittavan kudoksenäytteen uudelleen dekalsifioida esimerkiksi astiassa, joka sisältää pieniä määriä väkevää happoliuosta. Kudoksenäytteen koosta riippuen tulee näytteen uudelleen dekalsifoinnin päättymispistettä seurata tarkasti. Tämän jälkeen näyte tulee huuhdella ja kuivata, jonka jälkeen sen leikkausta voidaan jatkaa. Näyte tulee leikata tämän jälkeen nopeasti, sillä dekalsifoinnin hyöty on vain väliaikainen. (Bancroft & Gamble 2008, 96.)

Leikkauksessa tarvitaan tekniikkaa ja kädentaitoja. Tarvittavia välineitä ovat: mikrotomi, vesiasia, kuuma levy (+48 °C) leikkeiden kuivattamiseksi, pinsetit, siveltimiä, leikkausveitsi, näytelasiteline, puhtaita näytelaseja, neuloja, kylmälevy (-18 °C) ja permanenttitussi/lyijykynä. (Bancroft & Gamble 2008, 94.) Välineitä on esitetty kuvassa 5, jossa näkyy leikkauksessa käytettäviä välineitä.



Kuva 5. Leikkausvälineitä: kylmätaso, jossa blokkeja, lämpöhaude, mikrotomi, siveltimiä, leikkaaja (Karhu 2011).

Ennen leikkausta näytteet järjestellään jäälevylle numerojärjestykseen. Tämä kovettaa parafiinin kudoksen sisällä sekä ympärillä, tehden sekä näytteestä että parafiinista yhtenäiset, mikä helpottaa leikkausta. Leikkeistä tulee tehdä rutiinomaisesti 3-4 μm :n paksuisia, mutta riippuen näytteestä, voi leikkeen paksuutta vaihdella. Leikkauksen tulee tapahtua rauhallisin vedoin. Jos leikkauksessa on ongelmia, voi näytemuotin pintaa lämmittää lämpimällä vedellä tai rauhallisella uloshengityksellä puhaltamalla. Tämä laajentaa näytemuottia, tehden leikkeestä hiukan tiiviimmän. (Bancroft & Gamble 2008, 95 - 96.)

Leikkeitä tehtäessä leike jää normaalisti sykkyrälle. Leikkauksen jälkeen leikattu kaistale täytyykin suoristaa ennen näytelasille siirtoa. Tämä tapahtuu vesiastiassa, jonka lämpötila tulisi olla 10 °C parafiinileikkeen sulamispistettä viileämpi. Näyte viedään veden pintaan kiiltävä puoli alaspäin. Viileä vesi, johon on lisättyä pintajännitettä poistavaa ainetta esimerkiksi alkoholia, vähentää jännitettä. Tämän avulla leike saadaan suoraksi. Leikkeen suoristumista voi auttaa siveltimen ja pinsettien avulla. Näytteen tulisi suoristua noin 30 sekunnissa. Pidempi aika kuumassa vedessä aiheuttaa liiallista laajenemista

vääristäen leikettä. Leikkeen suoristuttua sen alle viedään näytelasi ja leike siirretään lasille. Ilmakuplien muodostuminen leikkeen ja lasin väliin on vältettävä. Ilmakuplia voidaan vähentää esimerkiksi puhkomalla niitä neulalla. (Bancroft & Gamble 2008, 94 - 96.) Mikäli kovakudosnäytteitä leikattaessa on ongelmia, ne johtuvat usein heikosta fiksaatiosta. Tällöin kovakudosta koossapitävät kalsiumsuolat eivät ole täysin kelatoituneet, jolloin näyte on kova. (Bancroft & Gamble 2008, 96.) Lopuksi näyte asetetaan kuivumaan näytelasitelineeseen. On tärkeää kirjoittaa näytelasiin identifiointitunnus, jonka mukaan näyte voidaan tunnistaa. Tämä tulee tehdä värjäyksessä käytettäviä kemiallisia aineita kestäväällä kynällä (Bancroft & Gamble 2008, 94).

Näytelasille siirron ja kuivumisen jälkeen näyte asetetaan kuumalle levyille. Tämä sulattaa leikkeessä olevan tukiaineen, parafiinin. Levyn lämpötila tulisi olla lähellä parafiinin sulamispistettä. Korkeat lämpötilat voivat hajottaa kudoksen soluja, tehden tumista mustia, tai kuplivia. (Bancroft & Gamble 2008, 94.)

3.6 Värjäys

Jotta tutkittavien luuydinnäytteiden yksityiskohtien sekä rakenteiden kuvantaminen olisi mahdollista, on näytteitä yleensä tarpeellista värjätä kemiallisilla yhdisteillä valomikroskopointia varten. Toisaalta, kun näytteitä tutkitaan elektronimikroskoopilla, värin käyttö ei kuulu värjäysprosessiin. Tällöin näytteen soluja käsitellään raskasmetallisuoloilla, kuten lyijy tai uraani. (Bancroft & Cook 1994, 17.)

On yleinen käytäntö, että laboratoriot luovat omat menetelmänsä värjäyksistä. Tähän vaikuttavat patologioiden mielipiteet värjäysten diagnosointikelpoisuudesta, sekä bioanalyytikon kokemus värjäysten suorituksen onnistumisesta. Tässä työssä käytetään PKSSK laatukäsikirjan mukaisia värjäyksiä.

Seuraavana käsiteltävät värjäykset kuuluvat PKSSK:n rutiinimaisiin luuydinvärjäyksiin. Mikäli patologi näkee tarpeelliseksi tilata muita värjäyksiä, hän lähettää niistä pyynnöt bioanalyytikolle, joka suorittaa värjäykset värjäyspisteellä, joka on esitetty kuvassa 6. Tässä työssä käytetään vain

Hematoksyliini-eosiini-, PAS-, LEDER-, GIEMSA-, sekä GOMORI-värjäyksiä.



Kuva 6. Värjäyspiste (Karhu 2011).

3.6.1 Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Hematoksyliini-eosiini-värjäys (HE-värjäys) on perusvärjäys, joka tehdään jokaiselle laboratorioon saapuvalle näytteelle. Liitteessä 1 (Tuunanen, Luostarinen & Salmelainen 2010) esitetään hematoksyliini-eosiini-värjäysmenetelmä. Tällä värjäyksellä voidaan erotella lukuisia erilaisia rakenteita kudoksessa, kuten kasvaimen tumamuutokset, esimerkiksi mitoosit ja tumajyvästen korostuminen. Toisaalta kasvainsolukon sytoplasman värjäytymisestä voidaan tehdä päätelmiä kasvaimen tyypistä ja kasvainsolukon alkuperästä. (Tuunanen, Luostarinen & Salmelainen 2010.)

Hematoksyliini värjää kudoksen tumat sinimustan eri sävyillä, jolloin tuman rakenne voidaan saada esille. Eosiini puolestaan värjää sytoplasman vaalean ja tummemman punaisen eri sävyin. Hematoksyliinin ja eosinin suhde on oltava sopiva, etteivät niiden suhteet ole toista väriä peittävä. (Tuunanen ym. 2010.) Tämän suhteen löytämiseen on apuna kokemus sekä ohjeiden huolellinen noudattaminen.

3.6.2 PAS-värjäys

Periodic Acid Schiffiä, eli PAS-värjäystä, käytetään glykokeenin ja neutraalien limojen osoittamiseen. Liitteessä 2 (Tuunanen ym. 2010) esitetään PAS-

värjäys. Reaktiossa muodostetaan dialdehydejä, kun perijodihapolla hapetetaan glykogeenissa tai neutraaleissa limoissa olevien 1,2-glykolisten tai niiden aminotai alkyylisidonnaisista hiili-hiili-sidokset. Dialdehydit reagoivat Schiff-reagenssin kanssa niin, että muodostuu voimakkaan punainen reaktiotuote. Tämä johtuu Schiff-reagenssissa olevista emäksisestä fuksinista, natriummetabisulfiitista ja suolahaposta. Glykogeeni voidaan poistaa leikkeestä amylaasikäsittelyllä. Näin glykogeenin ja liman värjäytyminen voidaan erottaa. Neutraalit limat ovat PAS-positiivisia, eli punaisia. Happamat limat ovat PAS-negatiivisia eli sinisiä. (Tuunanen ym. 2010.)

3.6.3 Giemsa-värjäys

Liitteessä 3 (Tuunanen ym. 2010) esitetään värjäyksen suoritusmenetelmä. Giemsa -värjäystä hyödynnetään usein hematopatologisissa värjäyksissä. Sen avulla tarkastellaan luuytimien solujen morfologian yksityiskohtia. Värjäyksessä käytetään kahta azure-väriä, jotka sisältävät hieman eri tavoin käsiteltyä metyleenisinistä. Lisäksi värjäyksessä käytetään eosinia. (Tuunanen ym. 2010.)

3.6.4 Gomorin retikelivärjäys

Luuydinvärjäyksessä gomorin retikelivärjäystä käytetään erityisesti myeloproliferatiivisten tilojen ja karvasoluleukemian diagnosoinnissa. Tämä värjäys esitetään liitteessä 4 (Tuunanen ym. 2010). Gomorin retikelivärjäys värjää kollageenityyppi III:sta koostuvat hienojakoiset säikeet mustiksi, argyofiilisella hopeavärjäyksellä. (Tuunanen ym. 2010.)

3.6.5 Leder-värjäys

Leder-värjäystä käytetään eroteltaessa lymfaattisen ja myeloisen sarjan soluja, kun etsitään pahanlaatuisen lymfooman soluja. Näitä osoitetaan naftoli-AS-D-kloroasettiesteri-entsyymisubstraatin ja väriaineen avulla parafiinileikkeestä. Väriaineena toimii pararosalini. Liitteessä 5 (Tuunanen ym. 2010) esitetään käytetyn värjäysmenetelmän suoritus. (Tuunanen ym. 2010.)

3.7 Näytteen diagnosointi

Luuydinbiopsian rooli luotettavan diagnostinen ja informatiivinen rooli on kasvamassa yhtä tärkeäksi tutkimusmenetelmäksi kuin aspiraationäyte.

Aspiraationäyte on perinteinen luuytimen solumassasta otettava näyte pahanlaatuisen veritaudin diagnoosin tueksi ja hoidon seurantaan. (Vornanen 2007, 199.)

Dekalsifioitua näytemateriaalia, joka on valettu parafiiniin, pystytään nykyisin käyttämään esimerkiksi sytogeneettisiin tarkoituksiin tai lymfosyyttien tyyppien kvantitatiiviseen määrittämiseen potilaan luuytimestä. Nopeakasvuisessa pahanlaatuisessa taudissa tai hoitovasteen arvioinnissa tulisi olla käytössä pikaprosessointimenetelmä, jolla voidaan lyhentää leikkeiden valmistusaikaa yhteen tai kahteen vuorokauteen. (Vornanen 2007, 199.)

Luuydintä voidaan käyttää epäselvissä tilanteissa luuytimen solumäärän tarkasteluun sekä sulkemaan pois tiettyjen hematologisten tautien mahdollisuus. Tärkeä indikaatio on aplastisen anemian diagnoosin varmistaminen sekä muun muassa hypoplastisen myelodysplastisen syndrooman huomioiminen. Luuydinbiopsiasta voidaan tutkia solulinjojen morfologiaa, sekä proliferaatiota, eli lisääntymistä. Tilanteessa, jossa aspiraationäytteestä puuttuvat tietyt perusrakenteet, kuten luupalkit, saadaan luuydinbiopsiasta lisäinformaatiota osteoporoosin tai osteoskleroosin ja myeloproliferatiivisten tautien tai karsinoomametastaasien yhteydessä. (Vornanen 2007, 199.)

Luuydinaspiraatio otetaan rutiininomaisesti myös tilanteissa, joissa luuytimeen herkästi leviäviin pahanlaatuisiin, usein lastentauteihin kuten neuroblastoomaan, rhabdomyosarkoomaan tai Ewingin sarkoomaan, tarvitaan levinneisyys selvittelyä. Lisäksi luuydinbiopsiaa käytetään hoitovasteen arvioinnissa, seurantatutkimuksena sekä mahdollisen jäännöstaudin osoittamisessa. (Vornanen 2007, 200.)

4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli luoda Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymälle sopiva menetelmä kovakudosnäytteiden prosessoinnin nopeuttamiseksi mikroaaltouunitekniikan avulla. Tutkimuksessa esitettiin seuraavat tutkimusongelmat:

1. Mikä on Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä sopivin luuytimien pehmityslämpötila?
2. Onko luuydinnäytteiden diagnosointi värjäyksen jälkeen mahdollista, kun dekalsifointiin on käytetty mikroaaltomenetelmää?

5 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tässä opinnäytetyössä menetelmällisenä valintana ei käytetä ainoastaan yhtä tutkimustyyppiä, vaan useita. Tutkimuksessa yhdistellään toiminnallisen tutkimuksen, laadullisen tutkimuksen sekä määrällisen tutkimuksen piirteitä. Tällöin kysymyksessä on triangulaatio. Triangulaatiolla tarkoitetaan moninäkökulmaisuuksia eli sitä, että yhdistellään useita menetelmiä ja lähestymistapoja. (KvaliMOTV 2011.)

Vilkan ja Airaksisen (2003, 9) mukaan ”toiminnallinen opinnäytetyö tavoittelee ammatillisessa kentässä käytännön toiminnan ohjeistamista, opastamista, toiminnan järjestämistä tai järjeistämistä”. Tässä opinnäytetyössä päätarkoituksena on luoda menetelmä kudoksenäytteiden käsittelylle, joten tutkimuksen tarkoituksen kuvailee toiminnallinen opinnäytetyö. Toiminnallisessa opinnäytetyössä on ominaista yhdistää teoretieto oman alansa käytännön työhön. Tarkoituksena on, että tutkimusaineistosta saatua tutkimustulosta tulkitaan teoreettisen viitekehyksen perusteella siten, että tilaaja voi itse käyttää tutkimustietoa päätöksentekonsa ja ratkaisujensa tukena.

Vilka ja Airaksinen (2003, 57) nostavat esiin kysymyksen, millaista tietoa toiminnallisen opinnäytetyön tueksi tarvitaan? Tämän opinnäytetyön kannalta on perusteltua, että toiminnallisen opinnäytetyönluonteen lisäksi käytetään tutkimuksellisen opinnäytetyön piirteitä. Vaikka tutkimustulosten määrittäminen tilastollisten tunnuslukujen ja menetelmien avulla onkin tässä opinnäytetyössä hankalaa, ilmentyvät tunnusluvut laboratoriotuotinnassa, joka lähtökohtaisesti on määrällistä.

5.1 Tutkimusympäristö

Patologian laboratorio toimintaympäristönä on yksi Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymän (PKSSK) erityisyksikkö. Patologian erityisosaaminen perustuu histologiseen, sekä sytologiseen näytteenkäsittelyyn sekä prosessoinnin hallintaan. Peruskoulutuksessa sekä ammattikoulutuksessa bioanalytikko hankkii pätevyytensä toimia patologian laboratoriossa ammattihenkilönä. Erityisosaaminen saavutetaan työskentelemällä patologian laboratoriossa usean vuoden ajan. (Kannisto, Kangasniemi, Nurmi & Koivunen 2011, 10.) Joensuussa patologian laboratorio vastaa erityisosaamisellaan osaa kliinisestä diagnostiikasta, joka yhdessä muiden erityislaboratorioiden kanssa muodostaa sairaalan kliinisen toimintaympäristön.

Kliinisen laboratorion toimintaympäristössä diagnoosin tuottaminen nopeasti on potilaan hoidon kannalta ensiarvoisen tärkeää. Nykyisen tekniikan avulla diagnoosin tuotto kovakudosnäytteissä EDTA -menetelmällä kestää näytteen koosta riippuen 1 – 6 viikkoa, joka on nopeampien vaihtoehtomenetelmien läsnä ollessa jopa eettisesti arveluttavan aikaa vievää. Prosessin pituus johtuu siitä, että kovakudosnäytteiden leikkautuvuus on huono, johtuen kudoksen luonteenomaisesta kovuudesta. Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymän patologian laboratorioonkin on jo hankittu mikroaaltouuni, mutta valmiudet sen käyttöönottoon puuttuvat. Uuden laitteen käyttöönoton jälkeen kudoksen leikkautuvuus paranisi, ja diagnoosien nopeampi tuottaminen olisi näin mahdollista.

5.2 Aineiston hankinta

Tutkimuksessa käytettiin materiaalina patologian laboratorion toimittamaa luuydinkudosta sekä kaupallista OsteoSoft-liuosta (EDTA:ta sisältävä liuos). Näytteet kerättiin lääkintävahtimestarin toimesta vuoden 2011, viikkojen 8-13 aikana lääketieteellisten ruumiinavausten yhteydessä ja toimitettiin laboratorioon opiskelijalle tutkittavaksi. Näytteet säilöttiin fiksatiiviin tutkimuksen aloitukseen saakka, jolloin näytemateriaali pysyi tutkimuskelpoisena. Tutkimukseen saatiin kerättyä 6 käyttökelpoista luuydinnäytettä.

5.3 Aineiston käsittely

Aineisto käsiteltiin keväällä 2011, viikolla 13. Näytteet jaoteltiin kolmeen ryhmään: I. Näytteenkäsittely 37 °C, II. Näytteen käsittely 50 °C. Näitä kahta menetelmää vertailtiin laboratorion aiempaan dekalsifointimenetelmään (ryhmä III): näytteen käsittely huoneenlämmössä. Näytteet merkattiin juoksevilla numeroinnilla, siten että ensin blokkiin sekä laseihin kirjoitettiin päivämäärä (pvkk), seuraavaksi ryhmä roomalaisin numeroin (I/II/III) ja seuraavaksi näytteen juokseva numero. Esimerkiksi 3003-I-1 kertoo päivämäärän 30.3, näytteen dekalsifointilämpötilan: 37 °C, sekä, että kysymyksessä on ensimmäinen näyte (1.). Näytteiden käsittelyn jälkeen patologi arvioi näytteen morfologian sekä diagnosoitavuuden. Tulokseksi saatiin lämpötilan vaikutus luuydinnäytteiden dekalsifioinnin nopeuteen.

5.4 Tutkimuksen suoritus

Tutkimuksessa käytettiin Milestone Micromed T/T Mega –mikroaaltouunia, joka on tarkoitettu kliiniseen käyttöön. Näytteiden lämmitys vakioitiin 90 minuuttiin. (Taulukko 1-2.)

Taulukossa 1 esitetään menetelmä, jossa luuydinnäytettä käsiteltiin 90 minuuttia. Vaihe 1 kesti 20 minuuttia, jolloin lämpötila nostettiin aluksi 500 W:n teholla 37 °C, jonka jälkeen jatkui vaihe 2. Tämä piti vakio­lämpötilan 37 °C:ssa, johon mikroaaltouuni käytti 150 W tehoa.

Taulukko 1. Dekalsifointi 37 °C

Vaihe	Aika (min)	Teho (W)	Lämpötila (°C)
1	20	500	37
2	70	150	37

Taulukossa 2 esitetään toinen menetelmä, jossa luuydinnäytettä käsiteltiin 90 minuuttia. Aluksi vaiheessa 1 lämpötila nostettiin 500 W:n teholla 20 minuutissa 50 °C:n. Käsittely jatkui tauotta vaiheeseen 2, joka kesti 70 min. Vaiheessa 2 lämpötila pidettiin vakioituna 50 °C:ssa 200 W:n teholla.

Taulukko 2. Dekalsidointi 50 °C

Vaihe	Aika (min)	Teho (W)	Lämpötila (°C)
1	20	500	50

2	70	200	50
---	----	-----	----

Näytemateriaalina toimi patologian laboratorion toimittama obduktiomateriaali, kuusi näytettä. Kaksi ensimmäistä näytettä käytettiin tutkimuksen testiajoon. Materiaali poikkesi suunnitelmassa esitetystä materiaalista siten, että materiaali ei ollut luuydinbiopsialla otettua kudosta, vaan taltalla irrotettua luu-
luuydinmateriaalia.

Näytteet vietiin kuduskäsittelyyn, kun mikroaaltokäsittelyt olivat kestäneet 90 minuuttia. Mikroaaltouuniohjelmia ei keskeytetty käsittelyn aikana näytteen kovuuden testaamiseen, sillä sitä arvioitiin leikkautumisen arvioinnin aikana liitteessä 6 esitetyllä lomakkeella.

Kudosprosessointi kesti yön yli, jossa näytteille suoritettiin vedenpoisto, kirkastus, imeytys sekä valu. Aamulla näytteet valettiin parafiinilla ja leikattiin mikrotomilla näytelaseille. Mikäli näytteet eivät olleet tarpeeksi pehmeitä, ei parafiini ollut läpäissyt näytemateriaalia kauttaaltaan. Tällöin leikkauksessa kudos saattoi murentua. Dekalsifointi oli näin ollen epäonnistunut. Tätä tapahtui hieman leikkautumisen aikana.

Leikkauksen jälkeen näytelaseilla olleet näytteet vietiin värjättäviksi. Värjäykset suoritettiin laboratoriossa käytettävien värjäysohjeiden mukaisesti. Värjäysten jälkeen näytteet päällystettiin päällystysautomaatilla, jonka jälkeen ne toimitettiin patologin arvioitavaksi. Patologi arvioi mikroaaltokäsittelyn onnistumisen solumorfologian perusteella.

Solumorfologia saatiin esiin luuydinvärjäyksillä: hematoksyliini-eosiini, PAS, LEDER, GIEMSA sekä GOMORI. Arviointi tapahtui erilliselle lomakkeelle, joka laadittiin laaduntarkkailunäytteille ominaisen arvosteluasteikon mukaan. Näin voitiin vertailevasti arvioida tutkimuksen luotettavuutta standardinmukaiseen näytteen arviointiin vedoten. Arviointi tapahtui viikolla 16 ja tämä värjäytymisen arviointilomake on esitetty liitteessä 7.

Laboratoriotoiminta sujui hyvin opinnäytetyösuunnitelman avulla. Laboratoriossa työskenneltäessä täytettiin laboratoriopäiväkirjaa, johon kirjattiin

prosessin eteneminen, huomiot näytemateriaalista, työskentelyajat, sekä pohdinnat tutkimuksen aikana syntyvistä ongelmista ja jatkotutkimusaiheista. Tämä nosti tutkimuksen luotettavuutta, sillä laboratoriopäiväkirjaan pystyi palaamaan tulosten kirjoitusvaiheessa.

6 TULOKSET

Taulukossa 3 on tutkittu leikkautumisen onnistumista. Tätä arvioidaan keskiarvon avulla. Keskiarvo kertoo yksinkertaisesti havaintoarvojen kokonaispistemäärän, kun havaintoarvot lasketaan yhteen ja jaetaan niiden lukumäärällä. Tällä voidaan tarkastella nopeasti, kuinka lähelle parasta mahdollista tulosta havaintoarvoilla päästiin. (Ernvall, Pulli & Salonen 2003, 224). Johtopäätöksenä voidaan havaita onnistuneempi tutkimusmenetelmä.

Vertailuryhmänä käytettiin laboratorion käyttämää menetelmää, jossa dekalsifointi tapahtui huoneenlämmössä. Siitä huomaa, mihin tuloksilla tulisi päästä. Tulokset määriteltiin leikkautumisen sekä värjäytymisen arviointilomakkeilla saatujen tietojen pohjalta. Arviointilomakkeet ovat liitteinä 6 ja 7.

Taulukko 3. Leikkautumisen arviointi: tulokset

Näyte n:o	Pisteet					
	0	1	2	3	4	5
Huoneenlämpötil a A	0	1	2	3	4	5
Huoneenlämpötil a B	0	1	2	3	4	5
3003-I-1 (37°C A)	0	1		3	4	5
3003-I-2 (37°C B)	0	1	2		4	5
3003-II-1 (50°C A)	0	1		3	4	5
3003-I-2 (50°C B)	0	1		3	4	5

Taulukossa 3 havainnoidaan tuloksia leikkautumisen onnistumisen mukaan annettujen pisteiden avulla. Tutkittaessa leikkautumisen onnistumista

huomataan, että vertailumenetelmä (aikaisemmin käytössä ollut, huoneenlämmössä suoritettu dekalsifointi) saa parhaan pisteet. Tämä on laskettu keskiarvon avulla:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{(x_1 + \dots + x_n)}{n}$$

Kaava 1. Aritmeettinen keskiarvo (Tilastokeskus 2011).

Kaava kertoo, että saadut pisteet lasketaan yhteen ja lopuksi jaetaan tuloksien lukumäärällä:

37°C menetelmä saa keskiarvoksi (2+3):2= 2,5 pistettä ja 50°C menetelmä (2+2):2= 2 pistettä. Entinen menetelmä (vertailu) saa parhaan mahdollisen pisteen, eli 5.

Tutkittuja menetelmiä vertailtaessa 37 °C:n menetelmä saa keskiarvoksi 2,5 ja 50 °C:n menetelmä 2. Huomataan, että 37 °C:n menetelmä on saanut korkeammat pisteet.

Taulukoissa 4-7 esitetään näytteiden värjäytymisestä annetut pisteet. Tutkittaessa värjäytymisen onnistumista voidaan tarkastella, ovatko tulokset parhaita mahdollisia. Myös tätä on arvioitu keskiarvon avulla.

Taulukko 4. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 37 °C, näyte A (3003-I-1)

Hematoksyliini-eosiini	0	1	2	3		5
PAS	0	1	2	3		5
LEDER	0	1	2		4	5
GIEMSA	0	1	2	3		5
GOMORI	0	1	2	3		5

Keskiarvo: (4+4+3+4+4):5= 3,8 pistettä

Taulukko 5. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 37 °C, näyte B (3003-I-2)

Hematoksyliini-eosiini	0	1	2	3		5
PAS	0	1	2	3		5
LEDER	0	1	2		4	5

GIEMSA	0	1	2		4	5
GOMORI	0	1	2	3		5

Keskiarvo: $(4+4+3+3+4):5= 3,6$ pistettä

Taulukko 6. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 50 °C, näyte A (3003-II-1)

Hematoksyliini-eosiini	0	1	2	3		5
PAS	0	1	2	3		5
LEDER	0	1	2	3		5
GIEMSA	0	1	2		4	5
GOMORI	0	1	2	3		5

Keskiarvo: $(4+4+4+3+4):5= 3,8$ pistettä

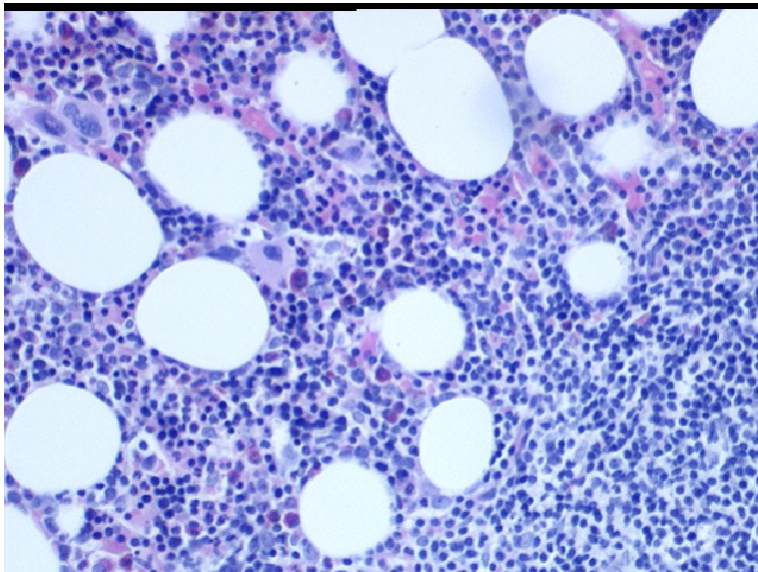
Taulukko 7. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 50 °C, näyte B (3003-II-2)

Hematoksyliini-eosiini	0	1	2		4	5
PAS	0	1	2	3		5
LEDER	0	1	2	3		5
GIEMSA	0	1	2	3		5
GOMORI	0	1	2	3		5

Keskiarvo: $(3+4+4+4+4):5= 3,8$ pistettä

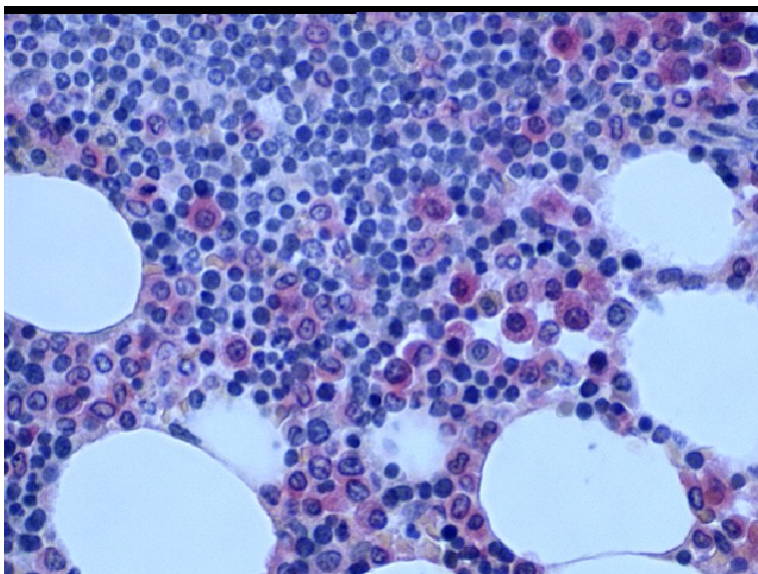
Tutkimuksessa saatiin $2 \times (5+5) = 20$ tulosta. Tämä tarkoittaa sitä, että kummankin menetelmän kahdesta näytteestä värjättiin yhdellä värjäyspaketilla, johon kuuluvat siis viisi värjäystä: hematoksyliini-eosiini-, PAS-, Leder-, Giemsa- ja Gomori värjäykset. Tulokseksi saatiin, että 37 °C:n menetelmä saavutti pisteitä yhteensä 7,4 ja 50 °C:n menetelmä 7,6 pistettä.

Seuraavaksi tutkitaan näytteiden diagnosoitavuutta. Vastauksen tutkimustulokseen antoi patologian laboratorion ylilääkäri. Kuviksi valittiin onnistuneet, selkeät kuvat. Nämä kuvaavat sitä tasoa, joka on diagnosointikelpoista. Huonommin onnistuneet kuvat on jätetty pois, sillä niitä ei käytännössä voida tulkita ollenkaan. Onnistuneen kuvan kriteeri on, että värjäyksellä on saatu esiin ne komponentit, joita kyseisellä värjäyksellä on yritetty erotella.



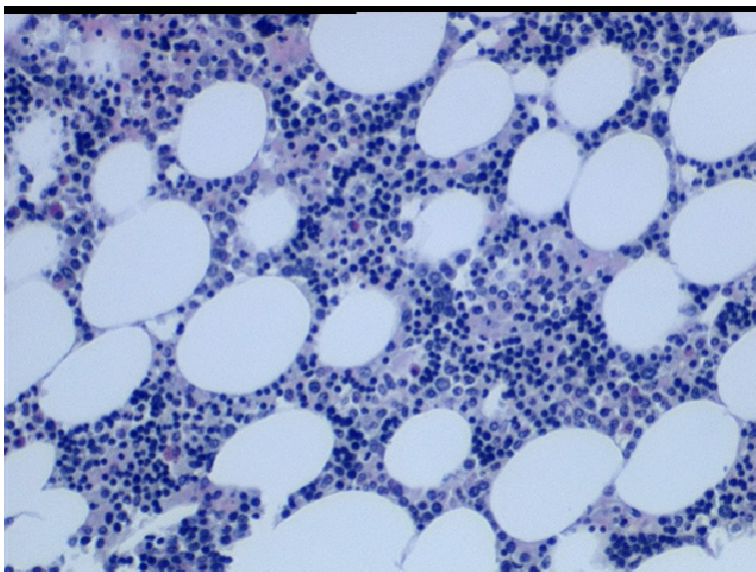
Kuva 7. Hematoksyliini-eosiinivärjäys 37 °C:n menetelmällä (Malinen 2011).

Vastaus: Hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä on saatu kudoksen tumat esiin sinimustana, sekä sytoplasma vaalean ja tumman punaisena. Hematoksyliinin ja eosinin suhde oli sopiva. Niiden suhteet eivät ole toista väriä peittävä.



Kuva 8. Hematoksyliini-eosiinivärjäys 50 °C:n menetelmällä (Malinen 2011).

Vastaus: Kuvassa 8 erottuvat hyvin toisistaan tumat sekä sytoplasmat. Myös tumajyväsiä voidaan löytää sopivalla suurennuksella.



Kuva 9. Gomori-värjäys 37 °C:n menetelmällä (Malinen 2011).

Vastaus: Kuvassa 9 huomataan kollageenityyppi III:sta koostuvat hienojakoiset säikeet mustina. Esimerkiksi Lymfooman diagnosoinnissa katsotaan aina luuydintä, kaulalta otettavan imusolmukenäytteen lisäksi. Gomori-värjäyksessä esimerkiksi karvasoluleukemia sekä myeloproliferatiiviset sairaudet tulevat esiin. Kuvassa on paljon rasvasoluja (suuret valkoiset ympyrät). Näyte on niin sanotusti hypoplastinen.

7 POHDINTA

7.1 Luotettavuus ja eettisyys

Hyvässä laboratoriotoinnassa on välttämätöntä, että työn on toistettavaa ja luotettavaa. Esimerkiksi ISO 9000 -sarjan standardit ja akkreditointia säätelevät standardit luovat ohjeiden kautta pohjan käsitteille reliabiliteetti ja validiteetti. Reliabiliteetti tarkoittaa tulosten pysyvyyttä, eli tulosten kykyä antaa ei sattumanvaraisia tuloksia. Validiteetilla asetetaan mittari sille, että käsillä oleva tutkimusmenetelmä kykenee mittaamaan sitä, mitä ollaan tutkimassa. (Vilka 2007, 177 - 179.)

Patologian laboratorio osallistuu kaksi kertaa vuodessa Labquality Groupin järjestämään laadunarviointikierrökseen (Labquality 2010). Tässä tutkimuksessa käytetään arviointikriteerinä vertailtavia luokituksia kuten laadunarviointikierröksellä, mikä omalta osaltaan kohottaa tutkimuksen validiutta kansallisellakin tasolla. Tässä opinnäytetyössä luodun menetelmän

validoi kaksi laboratoriossa työskentelevää bioanalytikkoo. Validointilomake on esitetty liitteessä 8. Validoinnin myötä luotu menetelmä voidaan ottaa laboratorion rutiinikäyttöön.

Tutkimuksessa kaikki materiaalikäsitteily, tulosten kirjaaminen sekä tulkinta on esitetty luonnollisessa muodossaan siten, että niitä ei ole muokattu tutkimuksen ulosantiin tai sopivammaksi. Prosessia ei ole myöskään muokattu toivotun tuloksen saamiseksi millään tavalla. Lähdekriittisyys on otettu huomioon tutkimusta tehdessä. Lähteitä on pyritty valitsemaan siten, että ne olisivat kansainvälisesti tunnettuja julkaisuja sekä laajoja lähdeoteoksia. Plagiointia, eli alkuperäisen tekijän ajatusten kopiointia, ei tässä työssä esiinny, vaan kaikki lähteisiin pohjautuvat tiedot on merkitty lähdeviittein, Pohjois-Karjalan ammattikorkeakoulun opinnäytetyöohjeiden mukaisesti. Näin ollen reliabiliteetti toteutuu tässä opinnäytetyössä.

Tässä työssä eettiset ohjeet pohjautuvat lakiin. Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä (L101/2001) määrittelee pykälän 20 mukaan kudoksen muuttuneen käyttötarkoituksen siten, että mikäli lääketieteellistä tutkimusta varten otettu näyte käytetään muuhun kuin suostumuksessa tarkoitettuun lääketieteelliseen tutkimukseen, on käyttö mahdollista ainoastaan tutkittavan suostumuksella. Mikäli tutkittava on kuollut, Valvira voi perustellusta syystä antaa luvan tutkimuksen suorittamiseen. Jos näytteitä luovutettaessa tai käytettäessä ei käsitellä henkilötietoja, riittää kuitenkin pelkkä terveydenhuollon toimintayksikön lupa (L101/2001.)

Suoritettussa tutkimuksessa käytettiin laboratorion toimittamia obduktionäytteitä, joissa ei ollut potilaiden henkilötietoja. Näytemateriaalille luotiin oma tunnistusjärjestelmä, johon ei sisällynyt potilaan tietoja. Tässä tutkimuksessa potilaan tietojen käsittely oli perusteetonta tutkimuksen onnistumisen kannalta.

Standardit ohjaavat laboratoriotointia. Patologian laatujärjestelmä perustuu IAP:n (International Academy of Pathology) suositukseen toiminta- ja laatujärjestelmäohjeista, ISO 9000 -sarjan standardeihin ja akkreditointia säätelevät standardeihin: SFS-EN ISO/IEC 17025 ja SFS-EN ISO 15189.

Tähän kuuluvat laboratoriotoinnin osalta muun muassa laitteiden huolto ja kalibrointi. (International Academy of Pathology (IAP Suomen osasto 2009.) Tässä työssä, kuten työntekijänä muutenkin, sitouduttiin noudattamaan näitä standardeja. Näin myös validius tuli huomioitua.

7.2 Tulosten tulkinta ja johtopäätökset

Kovakudosnäytteiden nopeutettua käsittelyä lämmön avulla on testattu aiemminkin. HUSLAB:n (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) kuntayhtymän omistaman laboratoriolaitoksen (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri 2010)), patologian keskuslaboratoriossa tehdyssä tutkimuksessa testattiin lämmön vaikutusta luuydinnäytteiden värjäytyvyyteen sekä leikkautuvuuteen. Suurin huolenaihe nopeutetussa kalkinpoistossa oli tuolloin immunohistokemiallisten värjäysten onnistuminen mikroaaltoprosessoinnin jälkeen. Tulokset olivat tässä tutkimuksessa hyviä: mikroprosessin aikana kudokseen ei havaittu tapahtuvan mitään tuhoa ja myös kudoksen morfologian säilyvyys, sekä värjäytyvyys olivat hyviä. (Saranen 2005, 36 - 37.)

Mikroaaltosäteilyllä voidaan merkittävästi nopeuttaa kudosprosessointia. Se nopeuttaa käsittelyssä käytettyjen nesteiden kulkua kudoksessa soluja vaurioittamatta, sillä se ei riko kudoksen kovalenttisia sidoksia tai vetysilloja. Mikroaaltokäsittelyssä saadut värjäystulokset ovat olleet jopa parempia kuin tavanomaisen kudokäsittelyn jälkeen. (Helin 2007, 214.)

Lämpötilasuositukset vaihtelevat tahoittain laajasti. Eniten lämpötilan noston kudosprosessoinnissa sanotaan vaikuttavan immunohistokemialliseen värjäykseen. Bancroft ja Gamble toteavat kirjassaan *Theory and practice of histological techniques*, että lämpötilaa, joka nostetaan 45 °C:een, voidaan käyttää tehokkaasti, mutta korkeampi lämpötila voi olla vahingollista myöhemmin immunohistokemiallisessa värjäyksessä. Toisaalta he suosittelevat kovakudosnäytteiden lämpötilaksi huoneenlämpötilaa 18 - 30 °C. (Bancroft & Gamble 2008, 84,340).

Opinnäytetyön tarkoituksena oli luoda käyttökelpoinen

mikroaaltouunimenetelmä luuydinten dekalsifointiin Joensuun patologian laboratorioon ja kirjoittaa tästä menetelmästä ohje laboratorion käytettäväksi. Menetelmäohje saatiin kirjoitettua. Tutkimuksen suorittaminen edellytti teorian sekä työskentelyn osalta erityisosaamista. Mikroaaltouunimenetelmään ja sen mikroaaltouunin toimintaan tuli perehtyä omatoimisesti, ilman aiempaa koulutusta. Myös luuydin materiaalina vaati erityisperehtyneisyyttä, ennen kuin menetelmän suunnittelu pystyttiin aloittamaan. Mikroaaltouunimenetelmän käyttö luuydinnäytteiden dekalsifoinnissa ei kuulu jokaisen laboratorion toimintaan, jolloin opinnäytetyön myötä opiskelijan valmiudet erityisosaamiseen kasvoivat.

Tässä opinnäytetyössä on saatu samansuuntaisia tuloksia kuin aiemmissa tutkimuksissa. Opinnäytetyöprosessin toteutuksen ja tulosten perusteella on havainnollistettu, että opinnäytetyössä luotu mikroaaltomenetelmä sopii Pohjois-Karjalan patologian menetelmävalikoimaan.

Leikkautuvuuden perusteella arvioituna 37 °C:n menetelmä sopii tutkimuksessa käytetyn näytemateriaalin perusteella paremmin patologian laboratorion menetelmävalikoimaan. Tämä näkyy parempana keskiarvona: 2,5 pistettä. Toisaalta värjäysten arvioinnin perusteella 50 °C:n menetelmä on parempi (19 pistettä) kuin 37 °C:n menetelmä (18,5 pistettä). Patologin arvioinnin perusteella 37 °C:n menetelmässä näytteiden diagnosoitavuuskelpoisuus oli alhaisempi kuin 50 °C:n menetelmässä. Tämä kertoo siitä, että vaikka leikkautuvuuden keskiarvo oli parempi 37 °C:n menetelmässä, ei 37 °C:n menetelmää voida käytännössä ottaa käyttöön, sillä värjäytyvyys kärsii. Tällöin diagnosoitavuuskelpoisuus on huonompi. Tästä syystä voidaan katsoa, että 50 °C:n menetelmä on käyttökelpoisempi kuin 37 °C:n menetelmä.

Tulosten perusteella voidaan tutkimusongelmaan 1. ”Mikä on Pohjois-Karjalan keskussairaalan patologian laboratoriolle sopivin luuytimien pehmityslämpötila?” vastata: 50 °C:n menetelmä on parempi diagnosoitavuuden kannalta. Tutkimusongelmaan 2. ”Onko luuydinnäytteiden diagnosointi värjäyksen jälkeen mahdollista, kun dekalsifointiin on käytetty mikroaaltomenetelmää?” voidaan vastata: Luuydinnäytteiden diagnosointi on mahdollista, kun dekalsifointiin on

käytetty mikroaaltouunimenetelmää.

Tutkimuksen kuluessa perehdyttiin patologian laboratorion toimintaan, tutkimusmenetelmän periaatteisiin, näytemateriaaliin ja sen hankkimiseen, sekä työvaiheisiin mahdollisimman tarkasti. Näiden tietojen perusteella luotiin tutkimussuunnitelma, jonka avulla tutkimuksen suorittaminen oli vaivatonta. Menetelmä pystyttiin toteuttamaan laboratorion välineillä sekä laboratorion toimittamalla materiaalilla. Menetelmän toimivuuteen perehdyttiin kirjallisuuden pohjalta ennen tutkimukseen ryhtymistä. Tällöin oli vahva aiempien kokemusten tuki siihen, että laboratorion toimintaa voidaan tämän tutkimuksen myötä parantaa.

Tutkimuksessa vertailtiin laboratorion aiempaa menetelmää tutkimusasetelman menetelmiin, minkä perusteella voitiin tarkastella Joensuun patologian laboratoriolle sopivaa menetelmää vaihtoehtojen läsnä ollessa. Ainut tutkimussuunnitelmasta poikkeava tekijä oli patologian laboratorion toimittaman näytemateriaalin luonne. Alun perin tarkoitus oli toteuttaa tutkimus todellisen muotoisista luuydinbiopsianäytteistä. Laboratorion toimittama näytemateriaali koostui obduktiosta taltalla kerätyistä näytteistä jotka kerättiin luun ja luuytimen rajapinnasta. Tällöin kovan luun suhde luuytimeen poikkesi rutiinianalytiikassa käytettävästä luuydinbiopsianäytemateriaalista. Tutkimuksessa käytettävässä näytemateriaalissa oli enemmän kovaa luuta suhteessa biopsianäytemateriaaliin. Tämä muuttaa leikkautuvuuden onnistumista 90 minuuttiin mikroaaltouunikäsittelyssä, sillä kovan luun dekalsifointiaika on pidempi verrattuna luuydinäytteen dekalsifointiin. Tästäkin huolimatta tutkimus onnistui niin, että tutkimuksessa käytettävästä materiaalista saatiin tarpeeksi pehmeää ja leikkautuminen onnistui.

Tutkimuksessa käytetty mikroaaltouunimenetelmä on tutkimuksen myötä todettu hyödylliseksi sekä luotettavaksi luuydinmateriaalin tutkimusmenetelmäksi. Se nopeuttaa diagnostiikkaa sekä nopeuttaa tämän johdosta potilaan hoitopäätösten syntymistä. Uusi menetelmä on käyttökelpoinen ja valmis käytettäväksi validoinnin jälkeen.

7.3 Jatkotutkimusaiheet

Tutkimuksen aikana esiin nousi ajatuksia jatkotutkimusaiheista. Mikäli tutkimuksen asettamia dekalsifointiaikoja, että lämpötiloja tarkennettaisiin, voitaisiin luuydinanalytiikkaa nopeuttaa entisestään dekalsifioinnin osalta. Tämä edellyttäisi laajemman kirjon erilaisia lämpötila-aika-menetelmiä, kuten esimerkiksi Bancroft ja Gamblen toteama 45°C:n menetelmä.

LÄHTEET

- Aho, H. 1994. Histologiset menetelmät patologiassa. Turku: Turun yliopisto
- An, Y.H. Martin, K.L. 2003. Handbook of histology methods for bone and cartilage. New Jersey: Humana Press Inc.
- Bancroft, J.D. Cook, H.C. 1994. Manual of histological techniques and their diagnostic application. New York: Churchill Livingstone Inc.
- Bancroft, J.D. Gamble, M. 2008. Theory and practice of histological techniques. Philadelphia: Churchill livingstone Elsevier.
- Ernvall, S. Pulli, A. & Salonen, A.-M. 2003. Sosiaali- ja terveystieteiden matematiikka. Porvoo: WS Bookwell Oy.
- L101/2001. Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä. <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2001/20010101>. 4.1.2011.
- Helin, H. 2007. Nopeat kudostekniikat. Moodi-lehti nro 6.. Helsinki: Labquality Oy.
- Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri 2010. HUSLABin johto ja organisaatio. <http://www.hus.fi/default.asp?path=1,28,824,2049,2282>. 10.11.2010.
- International Academy of Pathology (IAP) Suomen osasto. 2009. Patologian laboratorion toimintajärjestelmä. <http://www.labquality.org/LQ/pdf.aspx?dir=3&path=Qualitor/laplkohj2009422.pdf>. 7.1.2011.
- Jakubowski. 2011. Methods of catalysis. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/catalysis/olmethodscat.html>. 31.03.2011.
- Kannisto, K. Kangasniemi, M. Nurmi, L. Koivunen, M. 2011. Laboratoriohoitajan osaamisvaatimukset patologian laboratoriossa. Bioanalytiikka-lehti. Helsinki: Suomen Bioanalytiikkoliitto ry.
- Karhu, O.-P. 2011. Kuvia laboratoriotöistä. 30.3.2011.
- KvaliMOTV. 2011. Triangulaatio. http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/kvali/L2_3_2_4.html. 4.1.2011.
- Labquality. 2010. Labqualityn laadunarviointipalvelut, patologia. http://www.labquality.org/LQ/pdf.aspx?dir=3&path=Toimintaohjelmat/2010-11_osaE_s.pdf. 5.1.2011.
- Mortimer, C.E. Hakkarainen, M. 2001. Kemia. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Pakkanen, M. Kangasniemi, K.-L. Opas, H. 1980. Kodin lääkärikirjasto 3. Espoo: Weiling+Göös.
- Pohjois-Karlan Keskussairaalan Patologian yksikön laatukäsikirja. 2010. Ulkoinen laaduntarkkailu, kansio n:o 21.
- Ruutu, T. Rajamäki, A. Lassila, R. Porkka, K. 2007. Veritaudit. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Salo, J. 2002. Bone resorbing osteoclasts reveal two basal plasma membrane domains and transcytosis of degraded matrix material. Oulu: Oulun yliopisto.
- Saranen, M. 2005. Kokemuksia nopeasta mikroaaltokudosprosessoinnista. Moodi-lehti nro.1. Helsinki: Labquality Oy.

- Solunetti. 2010. Osteosyytti. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/osteosyytti/>.
1.11.2010.
- Tilastokeskus. 2011. Verkkokoulu. 2.4 Keskiluvut - aritmeettinen keskiarvo.
<http://www.stat.fi/tup/verkkokoulu/data/tt/02/04/index.html>.
14.11.2011.
- Tuunanen, S. Luostarinen, H. Salmelainen, L. 2009. Patologian yksikön
laatukäsikirja Kansio n:o 12. Joensuu: Pohjois-Karjalan
Keskussairaala.
- Tuunanen, S. Luostarinen, H. Salmelainen, L. 2011. Patologian yksikön
laatukäsikirja Kansio n:o 12. Joensuu: Pohjois-Karjalan
Keskussairaala.
- Tuunanen, S. Salmelainen, L. 2010 Patologian yksikön laatukäsikirja Kansio n:o
12. Joensuu: Pohjois-Karjalan Keskussairaala.
- Vilka, H. Toiminnallinen opinnäytetyö 2010.
Diasarja.http://vilka.fi/hanna/Toiminnallinen_ont.pdf. 12.11.2010.
- Vornanen, M. 2007. Patologia ja luuydin. Moodi-lehti nro. 6. Helsinki: Labquality
Oy.

1. Menetelmän periaate

Hematoksyliini on eosiniin yhdistettynä eniten käytetty yleisvärjäys, jossa tumavärinä käytetään emäksistä väriä hematosykliiniä. Hematoksyliini saadaan extrahoimalla Haematoxylon campechiarum kasvin sydänpuusta ja oksidoimalla ekstrakti yleisimmin esim. alumiinisuolojen sekä natriumjodaatin avulla. Hemateiini on itsessään hapan, mutta mordantin lisäyksen jälkeen kuitenkin toimii emäksenä. Hematoksyliini värjää tumat tyypillisesti sinimustan eri sävyillä, jolloin saadaan tumen rakenne esille. Erityyppiset eosini-väriaineet ovat hematoksyliinin kanssa yleisimmin käytetty kompinaatio. Eosiini on ksantiiniväri, jota käytetään 0,1 % vesiliuoksena. Se värjää solujen sytoplasman vaalean ja tummemman punaisen vaihtelevin sävyin. Paras erottelukyky eri kudskomponenteille saadaan suhteellisen voimakkaalla ja niukasti differentoidulla eosinivärjäyksellä.

Värjäyksen kriteerit

Hematoksyliini ja eosini värien suhde (eivät saa peittää toisiaan). Hematoksyliinin tulee värjätä selkeästi ja tarkasti tumarakenteet (DNA/RNA, heterokromatiini, nukleotit) ja sytoplasmien RNA, ihon keratinisoituneet rakenteet. Eosiinin tulee erotella selkeästi punaisen eri sävyin sidekudusrakenteet (kollageeni), poikkijuovainen lihas sekä solujen sytoplasma, ja lisäksi sen tulee värjätä selkeän oranssin punaisiksi punasolut ja uloin epidermoksen kerros. Lisäksi kiinnitetään huomiota värjäyksen epätasaisuuteen ja epäpuhtauksien esiintymiseen (mm. värisakka, väriylijäämä, erilaiset kontaminaatiot).

2. Lääketieteellinen tausta

Perusvärjäyksenä He-värjäyksen avulla voidaan erotella lukuisia erilaisia rakenteita kudoksessa kuten kasvainten kyseessä ollen tumamuutokset (koon ja muodon vaihtelu, hyperkromasia jne.), mitoosit, tumajyvästen korostuminen. Kasvainsolukon sytoplasman värjäytymisestä voidaan tehdä päätelmiä kasvaimen tyypistä eli kasvainsolukon alkuperästä. Tulehdussairauksien kyseessä ollen värjäyksen perusteella voidaan erottaa useimmat tulehdussolut ja päätellä, onko kyseessä akuutti, subakuutti vai krooninen tulehdus kulloinkin vallitsevan solutyypin perusteella. Samoin granulomatoottinen tulehdus saadaan

värjäyksellä näkyviin.

Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Liite 1

2 (5)

Näytteen laatu

Kaikki histologiset parafiinileikkeet. Leikkeen paksuus 3-5 µm.

Objektilasi hiotut reunat.

Kiinnitys lämpölevyllä 60 C n.10min tai yön yli lämpökaapissa 40 C.

3. Laitteet ja välineet

- a. konevärjäys Sakura Tissue-Tek DRS 2000
- b. vetokaappi
- c. objektilaseja
- d. peitinlaseja
- e. värjäysautomaatti astioineen ja telineineen
- f. pinsetit
- g. suojakäsineet
- h. suodatinpaperi
- i. suodatinsuppilo
- j. mittapipetti

4. Reagenssit

- | | |
|----------------------------------|---|
| a. Ksyleeni, | VWR 28973.363 |
| b. Absoluuttinen etanoli | BERNER |
| c. 96 % etanoli | BERNER |
| d. Tislattu vesi | |
| e. Mayerin Hematosykliini (0,1%) | Reagena 190210 |
| f. Eosin Y | BDH 1800072 / Eosin Yellowish Merck 15935 |
| g. Väkevä etikkahappo | Merck 1.00063.2500 |

Liuokset:

Mayerin Hematoksyliiniliuos

Suodatetaan 600 ml valmista liuosta. Vaihdetaan kolmen viikon välein niin että, vanhaa hematoksyliiniä jätetään kolmasosa ja uutta suodatetaan lisäksi.

0,1 % Eosin

1 g Eosin Yellowish
1000 ml Aqua

Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Liite 1 3 (5)

Säädetään pH 10% etikkahapolla 4,8 – 4,9. Eosiini vaihdetaan kolmen viikon välein.

Tarkista maanantaisin eosiniin pH ja säädä tarvittaessa 10 % etikkahapolla (esim. lisää 30 µl). Vaihda värjäysliuokset joka kolmas viikko.

10 % etikkahappo:

10 ml väkevää etikkahappoa
90 ml aquaa

5. Varotoimenpiteet

Värjäys suoritetaan vetokaapissa. Tutustu reagenssien käytöturvallisuustiedotteisiin sekä hävittämishjeisiin.

6. Virhelähteet

Yleisimpiä ongelmia on joko voimakas yli- tai vaikea alivärjäytyminen, jolloin kudusrakenteiden erottaminen ei ole enää luotettavaa.

Mayer riittävän tuore liuos. Huomioi riittävä liuoksen vaihtoväli ja liuoksen suodatus.

Eosiini-värjäyksen onnistuminen riippuu värjäysajan pituudesta ja erityisesti on tärkeää, että huuhtelu/diffausajat ovat lyhyitä niin juoksevassa vedessä kuin nousevassa alkoholisarjassakin. Liian pitkät diffaukset eivät erottele riittävästi toisistaan lihas- ja sidekudosta ja tuovat esiin hematoksyliinin siniharmaansävyn sidekudokseen. Laaduntarkkailu: tekniikka 1/2010.

7. Kontrollit

Kudos itsessään toimii kontrollina.

8. Kirjallisuus

Histologiset menetelmät kurssi 1991, Kuopion yliopisto, anatomian ja patologian

laitokset, 1991.

Bancroft JD, Stevens A (eds.): Theory and Practice of histological techniques.
Churchill Livingstone, Edinburgh, London. Melbourne and New York, 1990.

Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Liite 1 4 (5)

9. Työn suoritusvaiheet

1. Ksyleeni	4 min
2. Ksyleeni	3 min
3. Abs. etanoli	1 min
4. Abs. etanoli	1 min
5. 96 % etanoli	1 min
6. 96 % etanoli	1 min
7. Tislattu vesi	30 s
8. Mayerin hematoksyliini	20 min
9. Huuhtelu juoksevalla vedellä	6 min
10. Eosin	2 min
11. Aqua	1 sek.
12. 96 % etanoli	30 s
13. 96 % etanoli	30 s
14. Abs. etanoli	1 min
15. Abs. etanoli	1 min
16. Ksyleeni	2 min
17. Ksyleeni	3 min
18. Ksyleeni	3 min

Päällystä näytelasit peitinkalvoautomaatilla.

Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Liite 1 5 (5)

11. Tulos ja sen tulkinta

Tuma sinimusta

Sytoplasma, lihaskuidut, kollageeni, punasolut ja fibriini ovat eriasteista vaaleanpunaista

10. Menetelmän periaate

PAS (Periodic Acid Schiff) – reaktiossa perjodihappo hapettaa glykogeenissa tai neutraaleissa limoissa olevien 1,2 –glykolisten tai niiden amino- tai alkyylidihannaisten hiili-hiili-sidokset, jolloin muodostuu dialdehydejä. Dialdehydit reagoivat Schiffin reagenssin kanssa, joka sisältää emäksistä fuksiinia, natriummetabisulfiittia ja suolahappoa. Tällöin muodostuu voimakkaan punainen reaktiotuote. Glykogeeni voidaan poistaa leikkeistä amylaasikäsittelyllä, jolloin glykogeenin ja liman värjäytyminen voidaan erottaa toisistaan.

Neutraalit limat ovat PAS-positiivisia, kun taas happamat limat tai niiden kaltaiset aineet kuten hyaluronihappo, entsyymiresistenssi sialomusiini tai sidekudoksen vahvasti hapansulfoitu lima ovat PAS-negatiivisia. Heikosti hapansulfoitu lima värjäytyy PAS-reaktiossa vaihtelevasti.

11. Lääketieteellinen tausta

Pas-värjäystä käytetään glykogeenin ja neutraalien limojen osoittamiseen.

Tyvikalvot (nenän limakalvo, paksusuoli), leukosyyttien sytoplasma ja Kupfferin solujen sytoplasma maksassa värjäytyvät punaisiksi. Tyvikalvojen värjäytyvyyttä käytetään hyväksi etsittäessä tyvikalvopaksuntumia munuaiskeräsistä.

Pas-värjäys soveltuu hyvin sienirihmastojen osoittamiseen, esim. sieniesofagiitti. Sienillä on glykoproteiiniseinämiä, mikä värjäytyy voimakkaasti PAS-positiiviseksi.

12. Näytteen laatu

Värjäys tehdään formaliini fiksoiduille parafiinileikkeille.

13. Laitteet ja välineet

Sakura Tissue-Tek värjäysautomaatti
Vakiovarusteet

14. Reagenssit

Ksyleeni

PROL 28973.363

ongelmajäte

PAS-VÄRJÄYS (konevärjäys parafiinileikkeille) Liite 2 2 (4)

Absolutoitu etanoli	BERNER	
96 % etanoli	BERNER	
Tislattu vesi		
Perjodihappo	MERCK 1.00524.0100 / BDH 10432	
Schiffin reagenssi	MERCK 1.09033.0500 / BDH 19120	
	Liite 2	2 (4)

Depex	BDH A361254D	lasipullo 500ml
Mayerin Hematoksyliini Reagena 190210		muovipullo 5 l

Liuokset:

0,5 % Perjodihappo / Ylijodihappoliuos

3 g Perjodihappo
600 ml tislattua vettä

Vaihdetaan joka kolmas viikko

Schiffin reagenssi

Valmis liuos
Vaihdetaan joka toinen viikko

Mayerin Hematoksyliini

Valmis liuos
Suodatetaan ja vaihdetaan joka kolmas viikko niin että, vanhaa hematoksyliiniä jätetään noin kolmasosa ja uutta suodatetaan lisäksi.

15. Varotoimenpiteet

Värjäys suoritetaan vetokaapissa käyttäen suojakäsineitä. Tutustu reagenssien käyttöturvallisuustiedotteisiin sekä hävittämisohjeisiin.

Värjäysaltaat ja muoviletkut pestään vähintään joka kolmas keskiviikko. Värjäyslaitteen jätevesikouru huuhdotaan pesuaineella samaan aikaan (välinehuoltaja).

16. Virhelähteet

PAS-VÄRJÄYS (konevärjäys parafiinileikkeille) Liite 2 3 (4)

Vanhentuneet reagenssit sekä reagenssien ja näytteen valmistamisessa tapahtuneet virheet. Älä käytä värjäyksessä vanhentunutta (punaista) Schiffin reagenssia. Liuosten tulee olla huoneenlämpöisiä käyttöön otettaessa.

17. Kontrollit

Optimaalinen PAS-värjäys: Maksan glykogeeni ja nenän limakalvon levyepiteelin glykogeeni värjäytyvät purppuranpunaisiksi, paksusuolen kryptat ja musinoosi adenokarsinooma paksusuolella värjäytyvät punaisiksi.

18. Kirjallisuus

Histologiset menetelmät 16.-19.9.1991, luentomonisteet, Kuopion yliopisto, Anatomian ja patologian laitokset.

Theory and Practice of Histological Techniques, 1990

19. PAS-konevärjäys :Työn suoritusvaiheet

1. Xyleeni	4 min
2. Xyleeni	3 min
3. Abs	1 min
4. Abs	1min
5. 96 %	1 min
6. 96 %	1 min
7. Tislattu vesi	1 min
8. 0,5 % ylijodihappo	5 min
9. Aqua-huuhtelu	3 min
10. Schiffin reagenssi	12 min
11. Juokseva vesi	10 min

PAS-VÄRJÄYS (konevärjäys parafiinileikkeille) Liite 2 4 (4)

12. Haemalaun Mayer's	3 min
13. Juokseva vesi	10 min
14. 96 %	2 min
15. Abs	1 min
19. Abs	1 min
20. Xyleeni	3 min
21. Xyleeni	3 min

11. Tulos ja sen tulkinta

Liite 2 4(4)

Glykogeeni sekä neutraalit limat (muco- ja glykoproteiinit) värjäytyvät purppuranpunaisiksi.

1. Menetelmän periaate

Giemsa koostuu kahdesta azure-väristä , jotka kummatkin sisältävät hieman eritavoin käsiteltyä metyleenisineä. Giemsa sisältää myös eosinia. Giemsa värjää mikrobeja, kuten heicobakteerit, mutta myös tumien hetero- ja eukromatiinin ja nukleolusten RNA:n. Giemsa voidaan osoittaa myös syöttösolut, joiden granulat värjäytyvät metakromaattisesti violetin sävyisiksi. Regressiivinen värjäys, jossa toimivat coulombiset voimat I. sähköiset vetovoimat erimerkkisten varausten välillä.

2. Lääketieteellinen tausta

Giemsa on hyvin monikäyttöinen värjäys. Sitä hyödynnetään hematopatologisten solujen arvioinnissa kuten ihonäytteiden, luuytimen ja imusolmukkeen solujen morfologian yksityiskohtaisessa tarkastelussa.

3. Näytteen laatu

Formaliini fiksoitu parafiinileike. Normaali leikkeen paksuus.

4. Laitteet ja välineet

Käsivärjäys ja vakiovarusteet

5. Reagenssit

Ksyleeni R PROL28973.363

Ongelmajäte

Abs. etanoli Etanoli AA

96 % etanoli Etanoli A

Etikkahappo 100 % VWR MERC1.00063.2500

Giemsa-liuos VWR MERC1.09204.1000

Ongelmajäte

ja Reagena 180119

Depex BDH A361254D, lasipullo 500ml

Liukokset:

Giemsa-liuos

4 ml Giemsa

GIEMSA

Liite 3

2 (3)

46 ml aqua

Suodata maitosuodattimella.

0,25 % etikkahappo

2,5 ml etikkahappoa 100 %

ad. 1000 ml tislattua vettä

6. Varotoimenpiteet

Värjäys tehdään vetokaapissa käyttäen suojakäsineitä.

Giemsa-liuoksen hävitys formaliniviemäriin.

Myrkyllinen (sis. metanolia) hengitettynä ja joutuessaan iholle.

Helposti syttyvä. Säilytettävä tiiviisti suljettuna kuten tulenarka tuote.

7. Virhelähteet

Värin diffaaminen sopivaksi vaatii taitoa, muuten työvaiheiltaan yksinkertainen värjäys.

Alle 45 min värin inkubaatiossa leikkeet alivärjäytyvät.

Etikkahappo muuttuu vedeksi parissa viikossa.

8. Kontrollit

Kontrolli ei käytössä

9. Kirjallisuus

Theory and Practice of Histological Techniques, 1990

10. GIEMSA: Työn suoritusvaiheet (kaikki muut paitsi ei Heligo-bakteerit)

1. Xyleeni 3 min

2. Xyleeni 3 min

3.	Abs. etanoli	1 min		
	GIEMSA		Liite 3	3 (3)
4.	Abs. etanoli	1 min		
5.	96 % etanoli		1 min	
6.	96 % etanoli		1 min	
7.	Tislattu vesi	1 min		
8.	Giemsa-liuos		60 min	
9.	Kuivaus imupaperilla			
10.	Diffaus etikkahapolla	5-10 s	-	kunnes ilmestyy punertavia juovia.
11.	96 % etanoli	2-3-kastoa	-	liika väri huuhtoutuu pois, älä jätä pitkäksi aikaa!
12.	96 % etanoli		huuhtelu	
13.	Abs. etanoli		nopea huuhtelu	
14.	Abs. etanoli		nopea huuhtelu	
15.	Xyleeni	2,5 min		
16.	Xyleeni	2,5 min		

10. Tulos ja sen tulkinta

Mast-solujen granulat (metakromaattiset aineosat)	purppuranpunaisesta punaviolettiiin
Tumat (basofiiliset)	eriasteisen sinisiä
Sytoplasma (asidofiiliset)	vaaleanpunaisesta punaoranssiin
Sidekudos (asidofiiliset)	vaaleanpunaisesta punaoranssiin
Nukleolit:	heikon punaviolettistä tummansiniseen
Punasolut	punertavat
Eosinofiilien sytoplasma	punertavat

20. Menetelmän periaate

Retikuliinisäikeet osoitetaan luotettavasti argyofiilisellä hopeavärjäyksellä. Alkaalinen hopeanitraattiliuos tunkeutuu säikeisiin ja se pelkistetään niihin pelkistimen avulla (esim. formaliini Gömörissä). Yleensä värjäys vielä sävytetään kultakloridilla. Natriumtiosulfaatilla poistetaan pelkistymätön hopea ja ylimääräinen kultakloridi. Lopuksi värjätään tumat.

21. Lääketieteellinen tausta

Retikuliinisäikeet muodostavat tukiverkoston soluille ja ne ovat tärkeitä varsinkin maksassa, munuaisissa, pernassa, luuytimessä ja imukudoksessa. Gomorin retikkelivärjäys värjää kollageenityyppi III:sta koostuvat hienojakoiset säikeet. Säikeiden lisääntyminen liittyy useisiin tauteihin (mm. maksakirroosi, kasvaimet ja leukemiat). Luuydinbiopsiassa värjäyksen informaatioarvo esimerkiksi kroonisten myeloproliferatiivisten tilojen ja karvasoluleukemian diagnosoinnissa on suuri. Retikuliinisäikeiden värjääminen on apuna myös kasvainten erotusdiagnostiikassa.

22. Näytteen laatu

Värjäys tehdään käsin parafiinileikkeille. Leikkeet normaali paksuiset.

23. Laitteet ja välineet

- muoviset pinsetit/parafinoidut pinsetit
- tiheä suodatinpaperi

24. Reagenssit

Ksyleeni	VWR 28973.363	ongelmajäte
Absoluuttinen etanoli	BERNER	
96 % etanoli	BERNER	
Depex	GURR, BDH 36125	
25 % ammoniakki	Merck 5432	ympäristölle vaarallinen
Hopeanitraatti,		ympäristölle
vaarallinen		

Silver nitrate, AgNO_3 , BDH 30087

GOMORRIN RETIKKELIVÄRJÄYS (käsinvärjäys parafiinileikkeille) Liite 4 2 (6)

Kaliumhydroksidi, KOH	Merck 5033	syövyttävä
ongelmajäte		
Kaliumpermanganaatti, KMnO_4	BDH 10217	ympäristölle
vaarallinen		
Ammoniumferrisulfaatti, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Merck 3776	
Kaliummetabisulfiitti, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Merck 5057	
Kultakloridi, $\text{H}(\text{AuCl}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck 1582	
37% formaliini	BDH 101134A	
Natriumtiosulfaatti, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck 6516	

Liukokset:

0,5 % Kaliumpermanganaatti

Kaliumpermanganaatti	1 g	
Aqua	200 ml	Säilyy kylmiössä hyvin. värjäysmaljassa väh. kaksi viikkoa, seuraa värinmuutosta.

10 % Hopeanitraatti

Hopeanitraatti	20 g	
Aqua	200 ml	Säilytetään kylmiössä.

10 % Kaliumhydroksidiliuos

Kaliumhydroksiini	10 g	
Aqua	100 ml	Säilytetään kylmiössä.

Ammoniakkihopealiuos

10 % hopeanitraattiliuosta	10 ml
10 % kaliumhydroksidiliuosta	2,5 ml

- tähän sakkaiseen liukokseen lisätään tipoittain ammoniakkia, kunnes sakka on täysin liuennut.
- lisätään uudelleen 10 % hopeanitraattia tipoittain, kunnes sakka hyvin ravistamalla vielä liukenee ja liuoksen väri muuttuu opaaliksi.
- lisätään aquaa, kunnes tilavuus on kaksinkertainen
- suodatetaan imupaperilla
- liuos tehdään juuri ennen värjäystä

2 %	Ammoniumferrisulfaattiliuos			
	Ammoniumferrisulfaattia	4 g		
	Aqua	200 ml	Säilyy kylmiössä hyvin,	
GOMORRIN RETIKKELIVÄRJÄYS (käsinvärjäys parafiinileikkeille)			Liite 4	3 (6)
			värjäysmaljassa	n. 2
			viikkoa.	
2 %	Kaliumdisulfaattiliuos			
	Kaliummetabisulfiitti	5 g		
	Aqua	250 ml		
20 %	Formaliini			
	37 % formaldehydi	25 ml		
	Aqua	25 ml	Säilyy	2-3 viikkoa
	kylmiössä.			
1 %	Kultakloridiliuos (kantaliuos)			
	Tetraxhlorogold (III) –Saure Gelb	1 g		
	Aqua	100 ml	Säilytetään kylmiössä.	
			Säilyy vuosia.	
0,2 %	Kultakloridiliuos (työliuos)			
	1 % kultakloridiliuosta	10 ml		
	Aqua	40 ml	Vaihdetaan,	kunnes
		liuokseen		
			syntyy mustaa sakkaa.	
2%	Natriumthiosulfaattiliuos			
	Natriumthiosulfaattia	4 g		
	Aqua	200 ml	Säilyy kylmiössä hyvin,	
			värjäysmaljassa n. 2 viikkoa.	

25. Varotoimenpiteet

Värjäys suoritetaan vetokaapissa ja on käytettävä nitrilikäsineitä.
Hopealiuokset kerätään yhteen ongelmajätteeksi.

26. Virhelähteet

Ongelmallisinta värjäyksessä on hopean käyttäytyminen. Voi olla ylivärjäytynyt, jolloin myös solut pelkistyvät. Liian vähäisessä reaktiossa säikeet erottuvat huonosti. Lisäksi hopean saostuminen väärin paikkoihin leikkeessä ja mahdollisiin epäpuhtauksiin lasilla.

GOMORIN RETIKKELIVÄRJÄYS (käsinvärjäys parafiinileikkeille) Liite 4 4 (6)

Vanhentuneet liuokset sekä liuosten ja näytteen valmistamisessa tapahtuneet virheet.

Kaiken tarvittavan lasitavaran oltava ehdottoman puhdasta.

Työvälineinä ei saa käyttää mitään metallista valmistettua.

Hopealiuoksen valmistuksessa ja säilytyksessä käytetyt lasiastiat laitetaan erikseen likoamaan mäntynesteliuokseen. Eivät saa kuivua

Kriittisiä kohtia värjäyksessä

Konsentraatiot, pH, aika, lämpötila tarkkoja

Ammoniakaalisen hopealiuoksen valmistus >>> optimaalinen määrä ammoniakkia

hopeaa< ammoniakkia; hopeaioneja ei riitä joka paikkaan

- liian paljon> impregnointi epäonnistuu
- liian vähän> epäspesifinen värjäytyminen

Kloridi-ioneita sisältäviä liuoksia vältettävä, koska ne lisäävät hopean saostumista

Kaliumpermanganaatin tulee olla tuore

Pitkät seisotukset vedessä herkistämisen jälkeen aiheuttaa hopeaimpregnoinnin epäonnistumisen

Hopealiuoksen säilytys tulee olla kontrolloitua (pimeä, jääkaappi..)

Liian pitkä natriumtiosulfaattikäsittely aiheuttaa hopean liukenemisen hienorakenteisista säikeistä.

27. Kontrollit

Ei rutiinisti käytössä.

28. Kirjallisuus/liitteet

KYS:n ohje 1989.

Laboratoriohoitajien ammatillinen vuosijulkaisu 1992, SLaby n:o 4/92.

Theory and Practice of Histological Techniques, 1990

29. GOMORIN RETIKKELIVÄRJÄYS: Työn suoritusvaiheet

1. Xyleeni

5 min

2.	”	5 min		
3.	Abs. etanoli	2 min		
4.	”	2 min		
GOMORRIN RETIKKELIVÄRJÄYS (käsinvärjäys parafiinileikkeille)			Liite 4	5 (6)
5.	96 % etanoli	2 min		
6.	”	2 min		
7.	Juokseva vesi/Aqua	2 min		
8.	0,5 % Kaliumpermanganaatti	1 min		oksidointi herkistää
9.	Juokseva vesi	2 min		
10.	2 % Kaliumdisulfiitti	1 min		ruskea artefakta poistetaan
11.	Juokseva vesi	2 min		
12.	2 % Ammoniumferrisulfaatti	1 min		herkistää kudosta hopealle
13.	Juokseva vesi	2 min		
14.	Aqua-huuhtelu			
15.	Ammoniakki-hopealiuos	1 min		
16.	Aqua	20 sek		
17.	20 % Formaliini		3 min	pelkistys
18.	Juokseva vesi	3 min		
19.	0,2 % Kultakloridi	10 min		sävytys
20.	Juokseva vesi t. Aqua-huuhtelu			
21.	2 % Kaliumdisulfiitti	1 min		pysäytetään kultasävytys
22.	2 % Natriumthiosulfaatti	1 min		poistetaan ylim. hopea
23.	Juokseva vesi	2 min		
24.	96 % etanoli	1 min		
25.	96 %	1 min		
26.	Abs. etanoli	1 min		
27.	Abs. etanoli	1 min		
28.	Xyleeni	5 min		
29.	”	5 min		

30. Päälystetään peitinkalvoautomaatilla tai sopivan kokoisella peitinlasilla ja Depex-valmisteella.

11. Tulos ja sen tulkinta

GOMORRIN RETIKKELIVÄRJÄYS (käsinvärjäys parafiinileikkeille) Liite 4 6 (6)

Retikuliinisäikeet	mustia	
Tumat	mustia	
Lihaskollageeni		harmaaksi
Elastiini	ei värjydy lainkaan	

1. Menetelmän periaate

Leder-värjäyksessä osoitetaan naftoli-AS-D-kloroasettiesteraasi-entsyymisubstraatin ja väriaineen avulla parafiinileikkeestä. Substraattina käytetään naftoli-AS-D-kloroasettia ja väriaineena pararosaliniina. Useat esteraasit kestävät formaliini-parafiini-prosessoinnin.

2. Lääketieteellinen tausta

Käytetään eroteltaessa lymfaattisen ja myeloisen sarjan soluja, kun luuytimeä etsitään malignin lymfooman soluja. Värjäyksellä voidaan havainnoida näytteestä granulosityttejä promyelosyyteistä kypsiin neutrofiileihin sekä mast-soluja.

3. Näytteen laatu

Tehdään käsin parafiinileikkeille. Normaali leikepaksuus.

4. Laitteet ja välineet

Vakiovarusteet.

5. Reagenssit

Xyleeni	VWR 28973.363	Ongelmajäte
Abs. etanol	BERNER	
96% etanoli	BERNER	
Mayerin hematoxylin	Reagena 190210	
Pararosaline Hydrochloride	Sigma 3750	Myrkyllinen, Carc2
Natrium Nitriitti	Merck 6549	Myrkyllinen, hapettava, ympäristölle vaarallinen
Natrium Acetattrihydraatti	Merck 6267	
Sodium Diethyl-5,5 –barbiturate	Merck 6318	
HCL 37%	Merck 317	
Naphtol AS-D Chloroacetate	Sigma N-0758	
N,N Dimethylformamide	D 158550	Myrkyllinen

1 N HCL

Merck 905

Liukokset:**4% Natriumnitriitti**

0,1 g Natrium Nitrit
2,5 ml tislattua vettä Oltava tuore liuos.

Esteraasisubstraattiliuos

0,02g Naphtol AS-D Chloroacetate
2 ml N,N Dimethylformamide

Naphtol AS-D Chloroacetate säilytetään pakkasessa..
Lisää N,N Dimethylformamide juuri ennen käyttöä.

Michaelin veronaaliasetaatti –käyttöliuos

30 ml Veronaaliasetaattipuskuri –kantaliuosta
30 ml 0,1 N HCL

Säädä pH 7,42. HCL:llä alas ja asetaattipuskurilla ylös.

Michaelin veronaaliasetaattipuskuri (kantaliuos)

8,16 g Natrium Acetattrihydraatti
7,35 g Natriumdietyylibarbituraattia
250 ml tislattua vettä Säilytetään kylmiössä

0,1 N HCL (kantaliuos)

10 ml HCL 37%
990 ml tislattua vettä Säilytetään kylmiössä.

Värjäysliuos

0,1 ml 4% Pararosalinihydrokloridia
0,1 ml 4% Natriumnitriittiä

Sekoita hyvin ja odota 60 sekuntia, kunnes oljen väri kehittyy. Lisää 60 ml Veronaalisetaatti (I)-käyttöliuosta (pH 7,42). Säädä pH 6,3:een (varovasti tipottain) 1 N HCL:llä. Lisää 2 ml esteraasisubstraattiliuosta (III). Sekoita ja suodata imupaperilla.

Liuksen pitää olla maitomaisen vaaleanpunaista ennen suodatusta ja vaaleanpunaista sen jälkeen. Väriliuos säilyy päivän.

Jos pH laskee alle 6,3, tee liuos uudelleen. PH:n keinotekoinen nostaminen ei kannata.

4% Pararosalinihydrokloridi

0,5 g Pararosaline Hydrochloride
10 ml tislattua vettä
2,5 ml väk. HCL

Lämmitä kevyesti aineiden sekoittamisen jälkeen ja suodata. Säilytä kylmiössä.

6. Varotoimenpiteet

Värjäys tehdään vetokaapissa ja on käytettävä nitrilikäsineitä.

Substraattiväriuos kerätään ongelmajätteeksi.

N,N Dimethylformamide imeytyy ihon läpi. Roiskeet huuhdeltava iholta heti runsaalla vedellä.

7. Virhelähteet

Entsyymi ei siedä dekalsifinaatiossan käytettäviä happoja, joten luuytimen dekalsifointiin on suositeltavaa käyttää EDTA-formaliinia.

8. Kontrollit

Ei käytössä. Näytteessä olevat neutrofiilien ja mast-solujen granulat värjäntyvät aina.

9. Kirjallisuus

Theory and Practice of Histological Techniques, J. Bancroft, A. Stevens, sivu 406.

10. Leder: Työn suoritusvaiheet

1.	Xyleeni	5 min
2.	Xyleeni	5 min
3.	Abs. etanoli	2 min
4.	Abs. etanoli	2 min
5.	96% etanoli	2 min
6.	96% etanoli	2 min

7.	Tislattu vesi	2 min	
8.	Inkubaatio väriliuos sis. substraatin	60 min	huoneen lämmössä
9.	Huuhtelu tislatulla vedellä.		
10.	Huuhtelu tislatulla vedellä.		
11.	Huuhtelu tislatulla vedellä.		
12.	Mayerin hematoxylin	15 sek	
13.	Huuhtelu juoksevassa vedessä	10 min	
14.	Tislattu vesi	1 min	
15.	96% etanoli	1 min	
16.	96% etanoli	1 min	
17.	Abs. etanoli	1 min	
18.	Abs. etanoli	1 min	
19.	Xyleeni	5 min	
20.	Xyleeni	5 min	

11. Tulos ja sen tulkinta

Promyelosyyttien ja myelosyyttien granulat Tumat	helakan punaisia sinisiä
---	-----------------------------

Arviointiasteikko 0-5

0 pistettä= näytteestä ei saada ohuita arvioitavaksi kelpaavia leikkeitä (näyte erittäin kovaa, dekalsifointi epäonnistunut)

1 piste= näytteestä saadaan niukasti arviointiin kelpavaa materiaalia (näyte hivenen pehmennyt, dekalsifointi epäonnistunut)

2 pistettä= näyte jonkin verran dekalsifioitunut, mutta yhtenäisiä kudisleikkeitä ei saa leikatuksi (dekalsifointi jäänyt selvästi vajaaksi)

3 pistettä= näyte dekalsifioitunut riittävästi kudoksesta saa yhtenäisiä kudisleikkeitä, mutta se sisältää vielä osittain dekalsifioimatonta materiaali (leikkautuvuus on hyvä)

4 pistettä= näyte dekalsifioitunut lähes täysin, mutta näytteessä esiintyy vielä kovahkoja alueita, jotka rikkovat kudusrakennetta (erittäin hyvä leikkautuvuus luunäytteeksi)

5 pistettä= täysin dekalsifioitunut näyte erittäin hyvin leikkautuva (leikkautuu kuten pehmytkudos - "teoreettinen EDTA-menetelmällä")

Näyte n:o Pisteet

1.	0	1	2	3	4	5
2.	0	1	2	3	4	5
3.	0	1	2	3	4	5
4.	0	1	2	3	4	5
5.	0	1	2	3	4	5
6.	0	1	2	3	4	5
7.	0	1	2	3	4	5
8.	0	1	2	3	4	5
9.	0	1	2	3	4	5
10.	0	1	2	3	4	5
11.	0	1	2	3	4	5
12.	0	1	2	3	4	5
13.	0	1	2	3	4	5
14.	0	1	2	3	4	5

Leikkautumisen arviointi

Liite 6

2 (2)

15.	0	1	2	3	4	5
16.	0	1	2	3	4	5

Arviointiasteikko 0-5

0 pistettä= negatiivinen, epäonnistunut

1 piste= epäonnistunut, värjäytymistä havaittavissa vaikka erittäin niukasti

2 pistettä= tulos on heikko ja diagnoosin kannalta epävarma

3 pistettä= hyvä, diagnoosin kannalta riittävä mutta selkeää ali tai ylivärjäytymistä, epätasaisuutta, sakkaa jne.

4 pistettä= lähes moitteeton, lievää ali- tai ylivärjäytymistä, vähäistä epätasaisuutta jne.

5 pistettä= erinomainen

Näyte n:o	Pisteet					
1.	0	1	2	3	4	5
2.	0	1	2	3	4	5
3.	0	1	2	3	4	5
4.	0	1	2	3	4	5
5.	0	1	2	3	4	5
6.	0	1	2	3	4	5
7.	0	1	2	3	4	5
8.	0	1	2	3	4	5
9.	0	1	2	3	4	5
10.	0	1	2	3	4	5
11.	0	1	2	3	4	5
12.	0	1	2	3	4	5
13.	0	1	2	3	4	5
14.	0	1	2	3	4	5
15.	0	1	2	3	4	5
16.	0	1	2	3	4	5

LUUYDINNÄYTTEIDEN DEKALSIFIKAATIO

Validointi tehdään kaikista uusista menetelmistä, joita käytetään näytteenvalmistusprosessissa ja tutkimisessa. Tällaisia ovat esim. värjäysmenetelmät, uudet erikoismenetelmät ja vanhat menetelmät, kun niihin tehdään oleellisia muutoksia tai kun vanha laite korvataan toimintaperiaatteeltaan selvästi erilaisella laitteella.

1. Menetelmän käyttötarkoitus:

2. Menetelmän kuvaus ja laatuvaatimukset:

3. Tulos ja sen tulkinta:

4. Validoinnin suorittaja/t:

5. Suositus menetelmän käyttöönotosta ja käyttöönottoaajankohdasta:

6. Validointitestauksen suorittajien allekirjoitukset ja päiväys:

Taulukko 3. Leikkautumisen arviointi: tulokset.

Näyte n:o	Pisteet					
Huoneenlämpötil	0	1	2	3	4	5
a A						
Huoneenlämpötil	0	1	2	3	4	5
a B						
37°C A	0	1	2	3	4	5
37°C B	0	1	2	3	4	5
50°C A	0	1	2	3	4	5
50°C B	0	1	2	3	4	5

Taulukko 4. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 37 °C, näyte A

Hematoksyliini- eosiini	0	1	2	3	4	5
PAS	0	1	2	3	4	5
LEDER	0	1	2	3	4	5
GIEMSA	0	1	2	3	4	5
GOMORI	0	1	2	3	4	5

Taulukko 5. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 37 °C, näyte B

Hematoksyliini-	0	1	2	3	4	5
-----------------	---	---	---	---	---	---

eosiini						
PAS	0	1	2	3	4	5
LEDER	0	1	2	3	4	5
GIEMSA	0	1	2	3	4	5
GOMORI	0	1	2	3	4	5

Leikkautumisen ja värjäytymisen arviointitulokset

Liite 9

2 (2)

Taulukko 6. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 50 °C, näyte A

Hematoksyliini- eosiini	0	1	2	3	4	5
PAS	0	1	2	3	4	5
LEDER	0	1	2	3	4	5
GIEMSA	0	1	2	3	4	5
GOMORI	0	1	2	3	4	5

Taulukko 7. Värjäytymisen arviointi. Lämpötila 50 °C, näyte B

Hematoksyliini- eosiini	0	1	2	3	4	5
PAS	0	1	2	3	4	5
LEDER	0	1	2	3	4	5
GIEMSA	0	1	2	3	4	5
GOMORI	0	1	2	3	4	5



POHJOIS-KARJALAN
AMMATTIKORKEAKOULU

TUTKIMUSLUPAHAKEMUS

Haen/haemme lupaa suorittaa opinnäytetyöhön liittyvä tutkimus

Opinnäytetyön aihe: Lämpötilan vaikutus luuydinäytteiden dekaltsifiointien mikrosaltonaanimenetelmällä

Tutkimuksen toteutuspaikka/-yksikkö:

PKSSK:n Patologian laboratorio, Joensuu

Tutkimuksen:

a) kohde/kohdejoukko:

luuydin

b) aineiston keruumenetelmä:

Obduktiosta, kerääjä: lääkäintähtimies

c) aineiston keruun ajankohta:

viikot 8-13

Opinnäytetyön ohjaaja/t:

Elina Hyykkäinen

[Signature]

Työelämäohjaaja:

Anna Salminen

1 20

LIITTEET: - tutkimussuunnitelma
- toimeksiantosopimus



OPHTHALMO-KORJAAMO
AIKAJÄRJESTÖ

OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTO

SOPIJAOSAPUOLET:

TOIMEKSIANTAJA PKSSK, Patologian laboratorioYhteystiedot: Minna Salmelaus 013-1712935Sähköpostiosoite: Leena.Salmelaus@pkssk.fiOPISKELIJA Olli-Pekka KarhuYhteystiedot: Olli-Pekka, kathy@edu.hcp.fi

TOIMEKSIANTOSOPIMUS:

vara 2011

Osapuolet ovat tänään sopineet toimeksiannosta seuraavaa: (esim. rahoitus, aikarajat, tekijänoikeudet)

Opinnäytetyön ohjaajana PKAMK:ssa toimii Minna Rokela, Elna Lyytikäinen

Päiväys ja allekirjoitukset

vara 2011

Minna Salmelaus
Toimeksiantajan edustaja

Olli-Pekka Karhu
Opiskelija