

**RAUTA-JA PAPANICOLAOU-VÄRJÄTYN  
BRONKOALVEOLAARISEN  
LAVAATIOVALMISTEEN VERTAILU  
ASBESTOOSIN DIAGNOSTIIKASSA**

Jussi Kannisto

Ari Keituri

Opinnäytetyö  
Lokakuu 2012  
Bioanalytiikan  
koulutusohjelma

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma K09MBIOAN

KANNISTO, JUSSI & KEITURI, ARI:

Rauta- ja Papanicolaou-värjätyin bronkoalveolaarisen lavaatiovalmisteen vertailu asbestoosin diagnostiikassa

Opinnäytetyö 52 sivua, joista liitteitä 8 sivua  
Syyskuu 2012

---

Asbestoosi on vakava parantumaton keuhkosairaus, joka johtuu altistuksesta asbestipartikkeleille. Tärkeä diagnostinen toimenpide on selvittää asbestialtistuksen vakavuus. Tämä tapahtuu bronkoalveolaarisesta lavaatiovalmistesta asbestipartikkelit laskemalla. Opinnäytetyön tarkoituksena oli verrata keskenään rauta- ja Papanicolaou- värjäyksen kykyä tuoda esiin asbestipartikkelit bronkoalveolaarisesta lavaationäytteestä. Näyttemateriaalina olleista bronkoalveolaarisista lavaationäytteistä tehtiin sytosentrifugivalmistet ja suoritettiin niille asbestin tunnistamiseksi rautavärjäys. Näitä rautavärjättyjä valmisteita verrattiin samasta näyttemateriaalista tehtyihin Papanicolaou- värjättyihin Millipore- suodosvalmisteisiin, ja verrattiin näiden kahden eri menetelmän kykyä tuoda esiin bronkoalveolaarisen lavaationäytteen mahdollisesti sisältämät asbestipartikkelit.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa aiheesta, onko rautavärjätty bronkoalveolaarinen lavaationäyte soveltuvampi asbestikappaleiden määrittämiseen kuin vastaava Papanicolaou- värjätty näyte. Opinnäytetyön aihe saatiin Päijät- Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymältä (PHSOTEY), ja kokeellinen osuus suoritettiin yhteistyössä Päijät- Hämeen keskussairaalan patologian laboratorion kanssa.

Opinnäytetyö oli kvantitatiivinen kokeellinen työ. Näyttemateriaalina käytettyjä bronkoalveolaarisia lavaatiovalmisteita, joissa epäiltiin olevan asbestia, kertyi otokseksi viisi kappaletta, joten luotettavaa tilastollista analyysia tuloksista ei voitu tehdä. Näyttemäärästä johtuen, opinnäytetyö sai enemmän vertailevan tutkimuksen piirteitä. Kokeellisen vaiheen suorittamisen ja tulosten tarkastelun jälkeen, todettiin rautavärjättyjen sytosentrifugivalmisteiden olevan soveltuvampia asbestipartikkelien tunnistamiseen bronkoalveolaarisesta lavaatiovalmistesta.

---

Asiasanat: asbestoosi, asbesti, bronkoalveolaarinen lavaatio, rautavärjäys, Papanicolaou -värjäys

## **ABSTRACT**

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

KANNISTO, JUSSI & KEITURI, ARI:

The comparison of Prussian Blue staining and Papanicolaou staining in the Diagnostics of Asbestosis

Bachelor's thesis 52 pages, appendices 8 pages  
September 2012

---

Asbestosis is an incurable disease of the lungs caused by exposure to asbestos. An important part of the diagnosis of the disease is the evaluation of exposure to asbestos. This evaluation is done by counting the asbestos particles in bronchoalveolar lavage. The objective of this study was to produce information whether Prussian Blue staining method or Papanicolaou staining method is more suitable in making the asbestos particles more visible for the counting.

This study was planned to be quantitative in nature, but because of the small number of samples the study became more comparative in nature. The sample of the study consisted of five bronchoalveolar lavage samples. They were stained by using both methods, Prussian Blue and Papanicolaou. After microscopic analysis and the counting of the asbestos particles found, the conclusion were made. The Prussian Blue staining method was found to be more suitable in the detection of the asbestos particles in the bronchoalveolar lavage.

---

Key words: asbestosis, asbestos, bronchoalveolar lavage, Prussian Blue stain, Papanicolaou stain

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	5
2	ASBESTI, ASBESTOOSI JA MUUT ASBESTISAIRAUDET .....	6
2.1	Asbestin terveyshaitat .....	6
2.2	Asbestoosi .....	7
2.3	Muut asbestisairaudet .....	11
2.3.1	Asbestista johtuva keuhkosityöpä .....	11
2.3.2	Mesotelioma .....	11
2.3.3	Keuhkoplakit .....	12
2.3.4	Asbestiliitännäiset keuhkosairaudet .....	13
3	BRONKOALVEOLAARINEN LAVAATIONÄYTE JA SIIHEN LIITTYVÄT LÖYDÖKSET .....	14
3.1	Sytologinen näyte .....	14
3.2	Bronkoalveolaarisen lavaationäytteen otto .....	16
3.3	Bronkoalveolaarisen lavaationäytteen löydökset .....	17
4	SYTOLOGISET TEKNIIKAT JA VÄRJÄYSMENETELMÄT ASBESTIKAPPALEIDEN TUNNISTAMISEKSI BAL-NÄYTTEESTÄ .....	19
4.1	Sytosentrifugi .....	19
4.2	Rautavärjäys .....	21
4.3	Suodatinmenetelmä .....	23
4.4	Papanicolaou- värjäys .....	25
4.5	Asbestin kvantitointi .....	28
5	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE, TEHTÄVÄ JA TUTKIMUSONGELMA .....	29
6	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT .....	30
7	TUTKIMUKSEN SUORITUS .....	31
7.1	Rautavärjäyksen suoritus .....	31
7.2	Mikroskopointi .....	35
8	TUTKIMUSTULOKSET, POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	37
8.1	Tulokset .....	37
8.2	Pohdinta ja johtopäätökset .....	38
	LÄHTEET .....	41
	LIITTEET .....	45

## 1 JOHDANTO

Asbestoosi on elämänlaatua huomattavasti alentava sairaus johon vielä nykyäänkin, asbestin käyttöä rajoittavista määräyksistä huolimatta, sairastuu vuosittain 90- 120 ihmistä. Asbestoosin aiheuttaa pitkäaikainen altistuminen asbestipölylle. Tosin lyhytaikaisenkin altistuksen on todettu aiheuttavan erilaisia sairauksia, jotka ovat kaikki asbestiperäisiä. Suomessa työnsä puolesta asbestille altistuu vuosittain 500- 1000 henkilöä. Pitkään asbestilla altistuneita henkilöitä on elossa nykyään noin 50 000- 60 000 henkilöä. (Työterveyslaitos 2012.) Keuhkoihin kertyneen asbestin määrää voidaan mitata bronkoalveolaarisesta huuhtelunäytteestä eli BAL- näytteestä. Tämän keuhkoihin kertyneen asbestin määrän kvantitoinnin virallinen tutkimusnimike on BI- BAL- 2. (Fimlab 2012.)

Keuhkoihin kertynyt asbesti esiintyy kahdessa eri muodossa, paljaina kuituina sekä rautaproteiini-vaipan saaneina kuituina, englanniksi asbestos body. Nämä rautaproteiini-vaippaiset kuidut saadaan valomikroskooppisesti havaittavaksi käyttämällä histologisia ja sytologisia värjäystekniikoita. (Roggli 2004, 34- 36.) Käytetyt värjäystekniikat ovat Papanicolaou- värjäys ja rautavärjäys. Potilaan asbestialtistuksen määrittämiseksi, BAL- näytteestä lasketaan valomikroskooppisessa tarkastelussa värjäytyneiden asbestikappaleiden suhteellinen lukumäärä, kappaleita millilitrassa. (PHSOTey 2012; Roggli 2004, 36; Fimlab 2012.)

Opinnäytetyön aihe on saatu Päijät- Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymältä (PSHOTey), Päijät- Hämeen keskussairaalan patologian laboratoriolta. Patologian laboratorio harkitsee siirtyvänsä asbestoosin diagnostiikassa suodatinmenetelmällä valmistetusta Papanicolaou- värjätystä asbesti- BAL- valmisteesta sytosentifugitekniikalla valmistettuun ja rautavärjättyyn asbesti- BAL- valmisteeseen. Tästä siirtymästä seurasi tarve vertailla näiden kahden eri menetelmän kykyä tuoda esiin ja värjätä asbestikappaleet. Suoritimme menetelmien vertailun käyttämällä PSHOTey:n laatimia työohjeita kummallekin tekniikalle.

Työ rajattiin teorian osalta käsittelemään asbestia, asbestoosia, sekä muita asbestijohdannaisia sairauksia. Tämän lisäksi teoria sisältää asbestikappaleiden värjäyksessä käytettävät tekniikat, sekä menetelmät joilla asbestikappaleet erotellaan BAL- huuhteesta.

## 2 ASBESTI, ASBESTOOSI JA MUUT ASBESTISAIRAUDET

Asbesti on epäorgaanisista kuiduista koostuva silikaattimineraali, joka on materiaalina tunnettu ja ollut käytössä jo vuosituhansia. Ensimmäiset viittaukset tähän tulta kestäväan materiaaliin ovat peräisin jo 400-luvulta e.a.a. kreikkalaisen Theophrastuksen mainitsemana. Hän viittasi nykyään asbestina tunnettuun mineraaliin ”salamanterikivenä” myyttisen tulta ja lämpöä kestäväan liskon mukaan. Niistä ajoista nykypäivään, asbestia on löytynyt ja löytyy kallioperästä, ja sitä on louhittu käytettäväksi mitä moninai- simpiin tarkoituksiin. Teollistumisen kiihtyessä 1800-luvulle tultaessa asbestille keksit- tiin useita eri sovelluksia ja käyttötarkoituksia ja sen kysyntä kasvoi. Vuonna 1764 tie- dettiinkin jo yksin Euroopassa olevan toiminnassa kaksikymmentä erilaista asbesti- kaivosta. Kautta käyttöhistoriansa, asbestiin ja sen kanssa työskennelleisiin henkilöihin on liitetty epäilyt mineraalin aiheuttamista taudeista. Jo ensimmäisellä vuosisadalla j.a.a. epäiltiin asbestilouhoksissa työskentelevien henkilöiden keskuudessa ilmenevän keuhkotaudin olevan yhteydessä heidän louhimaansa kiviainekseen. Epäilyt, joka tultiin osoittamaan lääketieteellisesti toteen vasta 1900-luvun jälkipuoliskolla. (Skinner & Cat- herine 1988, 4, 42.)

### 2.1 Asbestin terveyshaitat

Asbestista tunnetaan kuusi eri muotoa, joista jokainen on erityyppinen silikaattimineraa- li, ja joiden kemiallinen koostumus vaihtelee huomattavasti. Nämä laadut ovat serpen- tiinimineraali krysotiili, tremoliitti, aktinoliitti, antofylliitti, riebeckiitti (krokidoliitti) ja gruneriitti (amosiitti), joista viisi jälkimmäistä kuuluu amfiboliitteihin, yleisesti hyvin laajaan alumiini- silikaatti- kiderakenteiseen kiviryhmään. (Skinner ym. 1988, 45, 192.)

Koska asbesti on ollut yleisnimitys hyvin laajalle materiaaliryhmälle, on asbestia sisäl- tävien tuotteiden kirjokin ollut hyvin laaja. Asbestia on käytetty esimerkiksi läm- möneristemassoissa, putkieristeissä, varaajissa, akustisissa katoissa, ilmanvaihtokana- vissa, liimoissa, bitumimaaleissa ja asbestipahvissa. Asbestilaadut monikäyttöisyytensä johdosta, levisivät nopeasti käyttöön monille eri teollisuuden aloille 1960- ja 1970- luvuilla. (Työterveyslaitos 2011; Nordman, Oksa, Karjalainen & Koskinen 2006, 7.)

Kautta käyttöhistoriansa asbestin kanssa työskentelevien keskuudessa on ilmennyt erilaisia keuhkosairauksia ja epäily asbestista tautien aiheuttajana on ollut olemassa. Jo niinkin varhain kuin 1930-luvulla asbestin aiheuttama ”pölytauti” nimettiin Englannissa ammattitaudiksi, josta tulee saada rahallista korvausta. Tästä eteenpäin lääketieteelliset tutkimukset asbestin haitoista yleistyivät, ja vuonna 1965 New Yorkissa pidetyssä konferenssissa asbestin biologisista vaikutuksista, todettiin asbestin olevan yhteydessä eri keuhkosyöpiin, myöhemmissä tutkimuksissa myös keuhkojen fibroottisiin tauteihin kuten asbestoosiin. (Skinner ym. 1988, 105.) Myös Suomessa on seurattu asbestiperäisten sairauksien ilmenemistä, ja vuodesta 1964 alkaen ammattitautirekisteriin on kirjattu asbestiperäiset sairaudet (Nordman ym. 2006,15).

Asbestin vaarojen selvittäessä Suomessakin alettiin pitää rekisteriä kaikista asbestille altistuneista henkilöistä, joita arvioitiin vuonna 1989 olevan noin 200 000 henkilöä, joista 50 000 arvioitiin voimakkaasti asbestille altistuneiksi. Asbestin kanssa työskentelystä seuranneista terveyshaitoista johtuen asbestin käyttö rakennusmateriaaleissa lopetettiin 1988, vuonna 1989 hyväksyttiin asetus jolla rajoitettiin asbestin käyttöä, ja joka 1993 laajeni asbestin ja asbestipitoisten tuotteiden valmistuksen, maahantuonnin, myymisen ja käyttöön ottamisen täyskielloksi. (Nordman ym. 2006,13; Asetus turvallisuutta asbestin käytössä koskevan yleissopimuksen voimaansaattamisesta, 1989; Valtioneuvoston päätös 1993.)

## 2.2 Asbestoosi

Asbestoosi on keuhkoissa molemminpuolisesti ilmenevä diffuusi soluvälitilan fibroosi eli sidekudoslisä, joka aiheutuu sisäänhengitysilman mukana keuhkoihin kulkeutuneista asbestikappaleista. Asbestoosin kehittyminen vaatii altistumisen suurelle määrälle asbestia; asbestoosin kehittymisen nopeus ja vakavuus ovat verrannolliset juurikin asbestialtistuksen suuruuteen. Mitä suurempi altistus on ollut kyseessä, sitä lyhyempi on taudin latenssiaika altistuksesta kliinisten oireiden ilmenemiseen. (Travis, Colby & Koss 2002, 815.)

Voimakas tai kohtalaisen voimakas jatkuva altistus asbestipölylle johtaa asbestoosiin 10- 20 vuodessa. Altistuksen ollessa poikkeuksellisen voimakasta, 1-2 vuoden mittainen altistus voi aiheuttaa taudin. Keskimääräinen latenssiaika taudin syntyyn on 20 vuotta.

(Nordman & Keskinen 2005, 731) Asbestipitoisuuden sitova raja-arvo Suomessa on 0,3 kuitua/cm<sup>3</sup>, kuitujen määrityksen ollessa vastaavanlainen: halkaisijaltaan alle 3µm ja pituudeltaan yli 5µm kokoinen kappale. (Nordman ym. 2006,14; Asetus turvallisuutta asbestin käytössä koskevan yleissopimuksen voimaansaattamisesta 1989.)

Työssään pitkäaikaisesti asbestille altistuneita henkilöitä on Suomessa elossa 50 000-60 000 henkilöä, ja tälläkin hetkellä erilaisissa rakennusten purku- ja kunnostustöissä 500- 1000 henkilöä altistuu asbestille (Työterveyslaitos 2010). Koska asbestista johtuvien sairauksien latenssiaika on hyvin pitkä, on mahdollista että asbestista johtuvien sairauksien määrä voi olla vielä jonkin aikaa nousujohteinen (Karjalainen, Piipari, Mäntylä, ym. 1996, 1001). Uusia asbestoositapauksia todetaankin Suomessa 90- 120 kappaletta vuosittain ja esimerkiksi asbestisyyöpien määrän oletetaan olevan korkeimmillaan vuosina 2010- 2015. (Huuhkonen, Jahkola & Oksa 2009. 1667; Työterveyslaitos 2010.)

Asbestoosin alkuvaihe on melko oireeton. Ensimmäinen ilmenevä oire on rasituksessa ilmenevä hengenahdistus, myöhemmässä vaiheessa yskä ja laihtuminen. Taudin varhaisessa vaiheessa, rasituksen aikana mitatuista verikaasuissa saattaakin näkyä viitteitä hypoksemiasta, myöhemmässä vaiheessa tämä näkyy myös levossa ollessa. Kliinisissä tutkimuksissa havaitaan sisäänhengityksen yhteydessä auskultoidessa krepitoivaa, hienojakoista kuivaa rahinaa, aluksi vain sisäänhengityksen alkuvaiheessa, myöhemmin koko sisäänhengityksen ajan. Sidekudoslisän kehittyminen alkaa keuhkojen alalohkoista ja tämä näkyy keuhkojen fysiologisissa mittauksissa. Virtaus- ja tilavuusmittauksissa havaitaan restriktiota, tilavuuden alenemista, sekä alentunut diffuusiokapasiteetti. Asbestikappaleita löydetään myös BAL- näytteestä, mutta tulee huomioda että tämä on vain indikaatio altistuksesta asbestille, eikä välttämättä merkki itse taudista. (Travis ym. 2002, 817; Nordman & Keskinen 2005, 731- 732.)

Asbestoosipotilailla, asbestikappaleiden mediaani BAL- näytteissä on ollut yli 100 asbestikappaletta/ml ja yli 80 % asbestoosipotilaista vähintään 10 asbestikappaletta/ml. Vertailuna voidaan todeta noin puolella tavallisista toimistotyöntekijöistä BAL- näytteiden asbestipitoisuuden olevan alle 0,1 asbestikappaletta/ml, kun taas asbestiruiskuttajien keskuudessa suurimmat arvot ovat olleet yli 1000 asbestikappaletta/ml. (Nordman ym. 2006, 18.)

Itse taudinmäärittäminen asbestoosiksi edellyttää asbestialtistuksen, latenssiajan sekä keuhkojen soluvälitilan fibroosin osoittamisen. Muut tekijät kuin asbesti keuhkofibroosin aiheuttajana tulee sulkea pois. Keuhkojen molemminpuoliset fibroottiset plakit tukevat altistusepäilyä, ja altistuksen voimakkuus voidaan arvioida suorittamalla asbestikappaleiden analyysi BAL- näytteestä. Diagnoosi varmennetaan suorittamalla keuhkoröntgenkuvaus tai keuhkojen ohutleiketietokonekuvaus (ohutleike- TT, tietokonetomografia). Kuvista todetaan keuhkofibroosi, sekä ohutleike- TT- kuvista asbestoosille tyypillisiä piirteitä. (Nordman & Keskinen 2005, 732.)

Ammattitautilaissa todetaan ammattitaudin olevan sairaus, joka todennäköisesti on pääasiassa aiheutunut fysikaalisesta, kemiallisesta tai biologisesta tekijästä työssä (Ammattitautilaki 29.12.1988/1343, 1§). Asbestoositapauksissa asbestoosin todistaminen ammattitaudiksi edellyttää tapauskohtaista työhistorian selvittämistä aina kansa- tai peruskouluaajoista aina nykyhetkeen asti, ja tämän tiedon avulla pyritään selvittämään asbestialtistuksen ajankohtaa. Arvioinnin suorittaa työhistorian tietojen pohjalta työterveyslääkäri, tai tilanteen vaatiessa työlääkätieteen erikoislääkäri. Työssään eniten asbestille altistuneita ryhmiä, ovat suoraan asbestin kanssa tekemisissä olleet henkilöt (asbestiruiskuttaja, putkieristät, asbestilouhostyöntekijät), ja asbestialtistuksen määrä onkin jo pääteltävistä näistä ammattinimikkeistä. (Nordman ym. 2006, 17,18.)

### **Asbestikappaleet keuhkoissa**

Termillä asbestibody kuvataan asbestikappaletta, joka on päällystynyt rautapitoisella proteiinimatriisilla. Ensimmäinen kuvaus asbestibodysta on peräisin vuodelta 1906. Tällöin partikkeleihin viitattiin pigmentoituina kristalleina, mutta vielä tuolloin niiden yhteyttä asbestoosiin ei tunnustettu. Termiä asbestibody käytettiin tiedettävästi ensimmäistä kertaa vuonna 1926, ja näihin aikoihin myös tunnustettiin partikkelin sisältämän kuidun olevan asbestia. Alusta asti asbestibodyn on todettu olevan muodoltaan hyvin tunnusomainen, hieman kaareva ja ”käsipainomainen”. Tämän partikkelin kullankeltaisen rautavaipan sisällä erottuu kirkkaana sen sisältämä asbestikuitu. Asbestibodyjen löytymistä pidetäänkin histologisena virstanpylväänä asbestialtistuksen selvittämisessä. (Roggli 2004, 34; Katzenstein 2006, 136.)

Asbestibodyt muodostuvat keuhkoissa seuraavanlaisessa prosessissa: Sisäänhengitysilman mukana puhtaat asbestikappaleet kulkeutuvat aina alveolitasolle asti, normaalisti alle 5µm kokoiset kappaleet poistuvat uloshengityksen yhteydessä, mutta sitä joskus nämäkin ja etenkin niitä suuremmat asbestikappaleet jäävät keuhkoihin. Tämän jälkeen tapahtuvasta ilmiöstä ei ole täyttä varmuutta. Oletetaan, että keuhkojen alveolaarit makrofagit tunnistavat nämä vierasesineet ja fagosytoivat ne. Tämän jälkeen makrofagit muodostavat asbestin ympärille rautaa sisältävän proteiinivaipan, jotta asbestikappaleet muuttuisivat elimistölle inaktiivisiksi. (Gray & McKee 2003, 56.) Toisen oletuksen mukaan asbestibodyn rautavaippa syntyy itsestään, kehon omien rautapitoisten yhdisteiden kiinnittyessä asbestiin ja pelkistyessä hemosideriiniksi (Travis ym. 2002, 814).

Oli rautavaipan muodostumisen perimmäinen syy kumpi hyvänsä, niin juuri tämä rautapitoinen rautaproteiinivaippa mahdollistaa asbestibodyjen tunnistamisen valomikroskooppisesti. Rautavärjäyksen on todettu olevan erittäin soveltuva juuri tähän tarkoitukseen. (Katzenstein 2006, 137.) Näiden asbestibodyjen määrä ei kuitenkaan vastaa täysin keuhkoissa olevaa asbestin kokonaismäärää, sillä vain osa asbestikappaleista päällystyy tällä rautaproteiinivaipalla. Todellinen asbestimäärä saattaa olla löydettyyn määrään nähden moninkertainen. (Travis ym. 2002, 814.) Paljaiden asbestikappaleiden määrä voi hyvinkin ylittää asbestibodyjen määrän, eri tutkimusten mukaan suhteessa 30:1 aina suhteeseen 200:1. Tämä epäsuhde selittyy sillä, että hyvin pienet, alle 1µm kokoiset kappaleet, eivät ympäröidy proteiinivaipalla ja niiden havainnointi vaatisi jo elektronimikroskooppitason tarkkuutta. (Katzenstein 2006, 137.)

Terminologiassa on myös kirjallisuuden parissa välillä epäselvyyttä. Joissain tapauksissa käsitteet asbestibody ja ferribody ovat menneet sekaisin tai niitä käytetään väärin. Tämä johtuu siitä, että joidenkin pölyyntyvien keraamisten kuitujen (lasi) on todettu myös muodostavan ympärilleen rautaproteiinivaipan. Näitä partikkeleja on sittemmin kutsuttu ferribodyiksi, joihin asbestibodytkin on välillä luettu kuuluvaksi. Tämä on kuitenkin virheellinen tulkinta, sillä valomikroskooppisesti asbestibodyn kirkas kuitu on erotettavissa ja sen proteiinivaippa on segmentoitunut (Liite 3). Nämä ovat erityispiirteitä, joiden avulla asbestibodyt voidaan erottaa ferribodeista. (Takahashi 1981; Travis ym. 2002, 814; Katzenstein 2006, 136.)

## **2.3 Muut asbestisairaudet**

### **2.3.1 Asbestista johtuva keuhkosityöpä**

Keuhkosityöpä kuuluu yleisimpiin syöpäsairauksiin, sitä esiintyy pääasiassa yli 50-vuotiailla. Suomessa sen esiintyvyys on miehillä suurempi kuin naisilla. Yleisimpiä oireita keuhkosityövässä ovat toistuvat keuhkotulehdukset, yskä, hengenahdistus ja veriset yskökset. Keuhkosityöpä leviää elimistössä helposti, johtuen keuhkojen runsaasta verenkierrosta. (Syöpäjärjestöt 2010.) Keuhkosityövät voidaan luokitella histologian mukaan kahteen eri pääluokkaan. Nämä luokat ovat, ei-pienisoluiset karsinoomat ja pienisoluiset karsinoomat (mikrosellulaarikarsinoomat). Suurin osa keuhkosityöivistä luetaan ei-pienisoluisiin karsinoomiin, jotka lajitellaan seuraavasti: suurisoluinen karsinooma, levyepiteelikarsinooma, sekä adenokarsinooma. Pienisoluinen karsinooma on todettu olevan voimakkaasti yhteydessä tupakan käyttöön. Pienisoluiselle karsinoomalle on tyypillistä voimakas jakautuminen ja etäpesäkkeiden muodostus. (Knuuttila 2005, 573-574.)

Asbestista johtuvan keuhkosityövän kehittymisalttiuteen vaikuttaa asbestikuitutyyppi (krysotiili vaarattomin, krokidoliitti vaarallisin) ja aika jona asbestille on altistuttu. Henkilöt jotka tupakoivat asbestialtistuksen lisäksi, omaavat kymmenkertaisen riskin saada keuhkosityöpä verrattuna tupakoimattomiin. Asbestialtistumisesta johtuvan keuhkosityövän toteamiseen voi kulua jopa yli 20 vuotta, koska kyseisellä syövällä on pitkä latenssiaika. Kun keuhkosityöpä on asbestista johtuvaa, tulee selvitettävä taudin työperäisyys, jotta voidaan arvioida hoitojen korvattavuus. Asbestin aiheuttama keuhkosityöpä on samanlainen histologiansa ja sijaintinsa suhteen kuin ns. tavallinen keuhkosityöpä, mutta ilmenee sitä aikaisemmin. (Nordman & Keskinen 2005, 729- 730; Huuhkonen ym.2009, 1667- 1670.)

### **2.3.2 Mesoteliooma**

Mesoteliooma voidaan jakaa hyvän- ja pahanlaatuiseen, eli syöpää aiheuttamattomaan ja syöpää aiheuttavaan. Suurin osa mesotelioomista kuitenkin on pahanlaatuisia. Pahanlaatuiset mesotelioomat voivat olla lähtöisin monista eri kudostyypeistä. Näitä mahdol-

lisiä kudostyyppejä ovat sidekudos, tukikudos sekä niiden yhdistelmä, jolloin mesoteliooma on lähtöisin molemmista kudostyypeistä. (Asbestos Resource Center 2012.)

Asbestista johtuvan mesoteliooman, kuten keuhkosyövänkin, syntyyn vaikuttavat asbestikuitutyyppi sekä altistusaika. Asbestikuiduista eniten mesotelioomalle altistavan on todettu olevan krokidoliitti, muiden kuitutyyppien kyvyn altistaa mesotelioomalle ollessa merkittävästi pienempi. Asbestikuidut ovat ainut mesoteliooman aiheuttaja. Mesoteliooman kehittyminen ei tarvitse välttämättä pitkäaikaista asbestialtistusta: vain kahden viikon altistus on riittänyt joissain tapauksissa taudin kehittymisen alkamiselle. Tupakkoinnilla ei ole mitään vaikutusta mesoteliooman syntyyn. Mesoteliooman mahdollisia ilmenemisaikkoja ovat sydänpussi, keuhkopussi sekä vatsakalvo. Mesoteliooma voi myös esiintyä kivespussissa, joka tosin on erittäin harvinaista. Keuhkopussissa esiintyvä mesoteliooma on yleisin Suomessa ilmenevissä tapauksissa. (Nordman & Keskinen 2005, 731; Asbestos Resource Center 2012.)

### **2.3.3 Keuhkoplakit**

Keuhkoplakit, eli parietaalipleuran fibroosit, ovat tarkkarajaisia, koholla olevia keuhkopussin hyaliinimuodostumia. Ajan mittaan nämä hyaliinimuodostumat kalkkeutuvat. Keuhkoplakit esiintyvät yleisimmin pallean keskiosassa, mediastinaalipleurassa sekä parietaalipleuran viidennen kymmenennnen kylkiluun välisellä alueella posterolateraalipuolella. (Nordman ym. 2006, 24.) Parietaalipleuran fibroosi on oireeton, mutta laajalle levinneenä se voi aiheuttaa keuhkojen toiminnan heikkenemistä. Keuhkoplakit kehittyvät vähäisestä altistumisesta asbestille, mutta näkyviä muutoksia keuhkoissa nähdään yleensä vasta muutaman kymmenen vuoden jälkeen mikä johtuu pitkästä latenssiajasta. Plakkien ilmaantumista voivat aiheuttaa myös tulehdukset, säteily, mesoteliooma ja kylkiluun murtumat. (Nordman & Keskinen 2005, 732.)

#### 2.3.4 Asbestiliitännäiset keuhkosairaudet

Eksudatiivinen keuhkopussin nesteily voi olla oireeton ja se todetaan yleensä sattumalta muiden tutkimusten yhteydessä. Nesteilyä todetaan lähinnä voimakkaasti asbestille altistuneilla, nesteily paranee itsestään, mutta se voi myös uusiutua. (Nordman & Keskinen 2005, 733.)

Pyöröateleaktaasi eli pseudotuumori, kehittyy fibroottisesta keuhkopussista ja sen alle jäävästä atelektaattisesta (ilmattomasta) keuhkokudoksesta. Pyöröateleaktaasin rakenne on sipulimainen, joka on hyvin nähtävissä tietokonetomografiakuvassa (TT-kuva). (Nordman ym. 2006, 25.)

Viskeraalipleuran diffuusi fibroosi on melko yleinen eksudatiivisen keuhkopussin nesteilystä johtuva tauti. Asbesti ei ole ainut sitä aiheuttava tekijä, ja myös muutkin tekijät voivat aiheuttaa sitä. Näitä ovat tuberkuloosi, nivelreuma sekä lääkkeitä esimerkiksi metysergidi (munuaisten vajaatoimintaan vaikuttava). Viskeraalipleuran diffuusi fibroosi on yleensä oireeton, mutta laajalle levinneenä se aiheuttaa keuhkojen restriktiivistä toiminnan heikkenemistä. (Nordman & Keskinen 2005, 733; Terveysportti 2012.)

Retroperitoneaalinen fibroosi on erittäin harvinainen tauti, eikä sen synnystä ja syistä tiedetä paljoakaan. Työperäinen asbestialtistuminen voi aiheuttaa sitä, sekä riskiä saada retroperitoneaalinen fibroosi kasvattavat myös tupakointi ja ergotamiinien (migreenilääke) käyttö. (Nordman & Keskinen 2005, 734; Terveysportti 2012.)

### 3 BRONKOALVEOLAARINEN LAVAATIONÄYTE JA SIIHEN LIITTYVÄT LÖYDÖKSET

Bronkoalveolaarinen lavaatio (BAL) on keskeinen tutkimusmenetelmä, joka mahdollistaa bronkeoli- ja keuhkorakkulatasoa (alveolaari) edustavien solunäytteiden ja eritteiden keräyksen. Nämä eritteet edustavat lähinnä proteiini- ja mikrobinäytteitä. Bronkoalveolaaristen lavaationäytteiden indikaatioita ovat diffuusit keuhkosairaudet (sarkoidoosi, pölykeuhkosairaudet; erityisesti asbestialtistuksen arviointi), infektiot (bakteerit, virukset ja parasiitit), pahalaatuiset keuhkokudoksen kasvaimet (leukemiat, lymfoomat ja metastaasit), hoitovasteen ja taudinkuvan seuranta, sekä ennusteen arviointi; vaikkapa kroonisen tulehdusprosessin seuranta. (Koivuniemi 1994, 221.)

BAL- näytteen tutkimusnimike on useimmiten BI- BAL- 1 tai BI- BAL- 2. BI- BAL- 1 tutkimusnimikkeellä olevasta BAL- näytteestä tehdään solututkimuksia, joita ovat esimerkiksi pitkittyneet alempien hengitysteiden infektiot ja infektiopäilyt, sekä jotkin keuhkokudoksen kasvaimet. BI- BAL- 2 tutkimusnimikkeellä oleva näyte on tarkoitettu ainoastaan asbestialtistuksen arviointiin. (Fimlab 2012a.) Bronkoalveolaarinen lavaationäyte on kuitenkin harvoin yksinään spesifinen diagnoosin suhteen. Diagnoosia on täydennettävä kliinisillä, fysiologisilla, radiologisilla ja muilla lääketieteellisillä tutkimuksilla. (Palange & Simonds 2010, 105)

#### 3.1 Sytologinen näyte

Bronkoalveolaarinen lavaatio kuuluu sytologisiin irtosolunäytteisiin (Johnston 1993, 162- 164). Sytologisella näytteellä tarkoitetaan joko yksittäisiä soluja tai soluryhmiä, jotka on kerätty mikroskooppisia tutkimuksia varten. Näitä solunäytteitä voidaan ottaa kaikista elimistön yli 200 erilaisesta solutyypistä, joten on ymmärrettävää että erilaisten sytologisten näytteiden keräämiseen on useita eri tekniikoita. Tekniikoita on viisi erilaista ja ne ovat irtosolu- eli eksofoliatiivinen näyte, harjaus- ja huuhtelunäyte, ohutneulabiopsia ja punktionäyte. (Rantala & Lounatmaa 1998, 81.)

Irtosolunäyte koostuu nopeasti uusiutuvasta ja irtoavasta epiteelisolukosta. Tätä solukoa voidaan kerätä näytteeksi esimerkiksi lastalla. Harja- ja huuhtelunäytteet edustavat

solukkoa, jonka irtoamista pitää avittaa joko harjaamalla tai huuhtelemalla. Ohutneulanäytteet otetaan kiinteästä kudoksesta nimensä mukaisesti ohuella neulalla; neulan kärki irrottaa soluja kudoksesta, jotka sitten imetään talteen ruiskuun. Punktionäyte edustaa irtosolukkoa, jota saadaan nesteen täyttämistä kystoista tai nestetäytteisistä ruumiinonteloista. Keräys tapahtuu neulalla ja ruiskulla. (Rantala & Lounatmaa 1998, 81.)

Fiksaatio on näytteen käsittelyä, joka pyrkii estämään solujen autolyysin ja bakteerien toiminnan, säilyttämään solujen alkuperäisen morfologian mahdollisimman hyvin, sekä säilyttämään solun sytokemiallisesti olennaiset elementit (Rantala & Lounatmaa 1998, 65; Bibbo 1997, 889). Näytteen fiksaatio tapahtuu fiksaatiivia käyttämällä. Hyvän sytodiagnostisen fiksaatiivin tulisi: läpäistä solukalvo nopeasti, minimoida solun kutistuminen, säilyttää solun morfologia, lopettaa autolyyttisten entsyymien toiminta, syrjäyttää solun sisältämä vesi, mahdollistaa solun läpikotainen värjäys, kiinnittää solu objektilaasiin, soveltua osaksi tulevia värjäyksiä, olla bakterisiidi, olla toiminnaltaan toistettavissa, sekä säilyttää solut pysyvästi. (Bibbo 1997, 889.) Rantala ja Lounatmaa kuitenkin toteavat, että kaikkia näitä tavoitteita ei voida saavuttaa yhdellä fiksaatiivilla, ja fiksaatiivin valinta on aina kompromissi (Rantala & Lounatmaa 1998, 65). Kaikki käytössä olevat sytologiset fiksaatiivit ovat alkoholipohjaisia, tavallisin ja käytetyin fiksaatiivi on 95 % etanoli (Bibbo 1997, 889). Taulukossa 1 on listattuna eri sytologisia fiksaatiiveja.

TAULUKKO 1. Sytologiset fiksaatiivit. (Bibbo 1997, 889, muokattu).

Fiksaatiivi	Huomioitavaa
<b>95% etanoli</b>	Nopea fiksaatio. Myrkytön ja luotettava. Aiheuttaa solujen morfologiassa pientä vääristymää kutistamalla soluja.
<b>80% isopropanoli</b>	
<b>80% propanoli</b>	
<b>100% metanoli</b>	Myrkyllistä. Ei voida käyttää Millopore – suodostekniikan kanssa.
<b>95% denaturoitu alkoholi</b>	95% etanolia, 100% metanolia ja 100% isopropanolia suhteessa 90:5:5
<b>Reagenssitason alkoholi</b>	100% metanoli, 80% isopropanoli, 90% asetoni
<b>Sovellettu alkoholi</b>	Etyyliasetaatia, metyyli – isobutyryliketonia, kerosiinia ja etanolia suhteessa 1:1:1:100

Käytössä olevat sytologiset fiksaatiotekniikat voidaan jakaa kolmeen eri luokkaan. Nämä luokat ovat 1) märkäfiksaatio, 2) märkäfiksaatio ilmakeivauksella ja 3) spray-fiksaatio. Käytetty fiksaatiotekniikka määräytyy näytekohtaisesti. (Bibbo 1997, 889.)

Märkäfiksaatiossa solunäyte siirretään heti keräämisen jälkeen fiksaatioliuokseen (keräyskohteen solut ovat luonnostaan kosteassa ympäristössä). Solunäyte lähetetään fiksaatioliuoksessa laboratorioon, missä näytteen jatkokäsittely tapahtuu mm. solujen värjääminen. Soluja ei missään vaiheessa altisteta suoraan ilmalle ja mahdolliselle kuivumiselle. (Bibbo 1997, 889.)

Märkäfiksaatiossa ilmakeivauksella, samoin kuin märkäfiksaatiotekniikassa, solunäyte siirretään keräämisen jälkeen välittömästi fiksaatioliuokseen. Näytteen kuitenkin annetaan fiksoitua vaan jonkin tietyn ajan, jonka jälkeen näyte poistetaan fiksaatioliuoksesta ja ilmakeivataan. Näyte lähetetään kuljetuskotelossa laboratorioon, jossa näyte siirretään 95 % etanoliliuokseen ennen värjäysprosessia. (Bibbo 1997, 889.)

Spray-fiksaatiossa solunäytteen päälle sumutetaan heti keräämisen jälkeen fiksatiivia. Tämän jälkeen fiksatiivin annetaan rauhassa kuivua näytteen päälle, minkä jälkeen näyte lähetetään laboratorioon. Laboratoriossa näytteen päältä poistetaan fiksatiivin sisältämä polyetyleeniglykoli huuhtelemalla näyte kahdessa erillisessä astiassa joissa on 95% etanolia. Näiden huuhtelujen tarkoituksena on myös varmistaa näytteen täydellinen fiksaatio. Tämän jälkeen näyte värjätään sille pyydytyllä tekniikalla. (Bibbo 1997, 889.)

### **3.2 Bronkoalveolaarisen lavaationäytteen otto**

Bronkoalveolaarisen lavaation näytteenotto suoritetaan siten, että huuhtelunestettä (pyrogeenitöntä 37 asteista keittosuolaliuosta) ruiskutetaan keuhkokudokseen ja joka ruiskutuksen jälkeen imetään takaisin. Ruiskutettava määrä on 10 x 20 ml. (Koivuniemi 1994, 221- 222.) Ennen toimenpidettä suoritetaan puudutus ja esilääkitys. Itse keittosuolaliuoksen ruiskutus tapahtuu fiberoskoopin avulla. (Duodecim 1988, 378) Takaisinimennästä saadaan saaliiksi 100- 150 ml. Jos saalis on alle 100 ml, on kyseessä niukka näyte, niukassa näytteessä on todennäköisesti bronkuslimakontaminaatiota. BAL- näyte on edustava alveolaaritason suhteen ja luotettava tuloksiltaan, jos siinä ei ole verikontaminaatiota, eikä bronkuslimakontaminaatiota. (Koivuniemi 1994, 221- 222.) BAL- näytteen solut hajoavat nopeasti keittosuolaliuoksessa, mistä johtuen ne

täytyy joko fiksoida tai toimittaa laboratorioon analysoitavaksi tunnin kuluessa (Palange & Simonds 2010, 107). Fiksaatioaineena BAL- huuhteessa käytetään 96 % etanolia. Fiksaatioainetta annostellaan näytteen suhteen 1:1, eli yhteen osaan BAL- huuhdetta lisätään vastaava tilavuus etanolia (HUSLAB 2011). Tämä ei tosin ole vakio, sillä eri näyte/etanoli suhteita on käytössä. Esimerkiksi Fimlab Laboratoriot Oy:n ohjekirjassa asbestoosin diagnostiikassa käytettävä BAL- huuhde neuvotaan fiksoimaan etanoliin suhteessa 1:2. (Fimlab 2012a.) Itse BAL- näytteen ottaminenkaan ei ole täysin riskitöntä ja siitä saattaa aiheutua seuraavanlaisia oireita potilaalle: ohimenevä kuumereaktio, atelektaasi ja bronkuskollapsi. Kuumereaktiota ja atelektaasia (keuhkokudoksen tiivistymä) esiintyy kun käytetään suuria nestemääriä. Bronkuskollapsiaa esiintyy herkemmin iäkkäillä henkilöillä kun käytetään koneimua huuhtelunesteen takaisinimennässä. (Tuokiainen & Taskinen 1988, 379.)

### 3.3 Bronkoalveolaarisen lavaationäytteen löydökset

BAL- näytteestä lasketaan kokonaissolumäärä, mahdolliset vierasesinepartikkelit ja suoritetaan solutyypin erittelylaskenta. Erittelylaskenta tehdään yleensä 200 peräkkäisestä solusta. Seuraavantyyppiset solut kuuluvat erittelylaskentaan: lymfosyytit, stimuloituneet lymfoidiset solut ja blastit, LGL- solut (large granular lymphocyte, isogranulaariset lymfosyytit), plasmasolut, neutrofiilit, eosinofiilit, basofiilit ja makrofagit. (Koivuniemi 1994, 223- 225.) Solulaskennassa on huomioitava onko asiakas tupakoitsija vai ei, sillä tupakointi vaikuttaa huomattavasti kokonaissolumäärään (Palange & Simonds 2010, 108). BAL- näytteen solujen kokonaismäärä on tupakoimattomilla alle  $150 \times 10^6/l$ , kun taas tupakoivien kokonaissolumäärä on yli  $350 \times 10^6/l$  (Fimlab 2012b). Tupakointi nostaa seuraavia solulöydöksiä verrattuna tupakoimattomiin: makrofagit, neutrofiilit, eosinofiilit ja levyepiteelit. Tupakointi laskee seuraavia solulöydöksiä verrattuna tupakoimattomiin: lymfosyytit ja plasmasolut. (Palange & Simonds 2010, 108.) On huomattava, että solujen erittelylaskennan tuloksiin vaikuttaa potilaan tautitilan ja elintapojen lisäksi myös erittelylaskennassa käytetty solujen keräysmenetelmä (Taskinen, Salmenkiva & Anttila 2005, 96). Taulukossa 2 on kuvattu solujen normaalin jakauman ylärajat BAL- näytteessä, käytetystä keräysmenetelmästä riippuen. Keräysmenetelmien tekniikat käsitellään tarkemmin kappaleessa 4.

TAULUKKO 2. Solutyyppien normaali jakauma BAL- näytteessä (mukaillen, Taskinen ym. 2005).

Solutyyppi	Suodatinmenetelmä, (Millipore)	Sytosentrifugi
Lymfosyytit	30%	20%
Neutrofiilit	5%	2%
Eosinofiilit	2%	2%
Makrofagit	63%	76%

## 4 SYTOLOGISET TEKNIIKAT JA VÄRJÄYSMENETELMÄT ASBESTIKAPPALEIDEN TUNNISTAMISEKSI BAL-NÄYTTEESTÄ

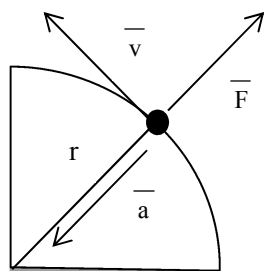
### 4.1 Sytosentrifugi

Sytosentrifugointi on tekniikka, jolla voidaan siirtää kaikkia sedimentoituvia partikkeleita tutkittavasta suspensioliuoksesta mikroskoipoitavalle näytelasille. Pääasiassa tutkittavat partikkelit ovat biologisia soluja, joten sytosentrifugia käytetäänkin laajasti kliinissä lääketieteessä ja biologisissa tutkimuksissa. Sytosentrifugilla valmistettaviin näytteisiin kuuluvat mm. virtsa, hengitystie, gastroskopia, ohutneula- ja selkäydinnestenäytteet. Tekniikalla on etujensa lisäksi myös haittansa: sentrifugointiprosessin aikana tapahtuu soluhävikkiä, eritoten pienissä soluissa. Prosessi aiheuttaa myös artifaktista muutosta solujen rakenteeseen. Rakenteen muutokset tosin eivät yleensä ole haitallisia, ja ne voivat olla jopa hyödyllisiä joissain tapauksissa. (Stokes & Logan 2004, 434.)

Sytosentrifugin toiminta hyödyntää ilmiötä nimeltä *keskihakukiihtyvyys* ja sen vastavoimaa. Keskihakukiihtyvyys aiheutuu siten, että sytosentrifugissa oleva näyte on massa, joka on pakotettu kiertämään ympyränmuotoista rataa vakionopeudella. Ympyräradalla olevan kappaleen nopeuden suunta kuitenkin vaihtuu jatkuvasti radan joka pisteessä, joten voidaan todeta kappaleella olevan kiihtyvyys, *keskihakukiihtyvyys*. Tämä kiihtyvyys voidaan pelkistetyksi laskea kaavalla:

$$a_c = v^2/r$$

jossa  $a_c$  on keskihakukiihtyvyys ( $m/s^2$ ),  $v$  on kappaleen nopeus ympyräradalla ( $m/s$ ) ja  $r$  on radan säde metreissä (sentrifugin säde). Tämän kiihtyvyyden suunta on kohti ympyrän keskipistettä, mutta koska Newtonin kolmannen lain mukaan jokaisella voimalla on olemassa yhtä suuri mutta vastakkaissuuntainen voima, on keskihakukiihtyvyydelläkin vastavoimansa. Juuri tämä vastavoima, *sentrifugaalivoima*, mahdollistaa sytosentrifugin toiminnan (kuva 1). (The Engineering ToolBox 2012.)



KUVA 1. Sytosentrifugoitaessa vaikuttavien voimien kuvaaja ( $r$  on roottorin säde,  $\overline{v}$  sytosentriugin nopeus,  $\overline{F}$  sentrifugaalivoima,  $\overline{a}$  keskihakukiihtyvyys)

Yksinkertaisesti ilmaistuna sytosentrifugoitaessa näyteliuoksessa tapahtuu seuraavia asioita: Sytosentrifugin kierrosnopeutta nostettaessa, näyteliuoksen kiinteisiin kappaleisiin vaikuttava sentrifugaalivoima kasvaa suuremmaksi kuin sitä vastustavat kitkavoimat, kuten esimerkiksi suspensionesteen aiheuttama noste. Tällöin siis kappaleiden vajomisnopeus kasvaa samalla kun sentrifugin kierrosnopeus nousee. Lisäksi tämä vajomisnopeus on suurempi isoilla ja tiheillä kappaleille kuin pienille ja kevyille. (Stokes & Logan 2004, 434.) Taulukoon 3 on merkitty erilaisille sytologisille näytteille soveltuvat sytosentrifugointinopeudet- ja ajat.

TAULUKKO 3. Cyto- Tek Centrifuge, malleille 4325, 4332 ja 4323 käyttöohjeen mukaiset sytosentrifugointiajat- ja kierrosnopeudet erilaisille sytologisille näytteille. (mukaillen, Sakura 1996, 3.12).

Näytetyyppi	Aika (minuutteja)	Kierrosnopeus (kierrosta/minuutti)
Virtsa	5	2000
Ruumiinonkaloiden nesteet- ja huuhteet	5- 10	2000
Selkäydin- ja aivoperäiset nesteet	5- 10	2000
Vatsa- ja pohjukaissuoli huuhteet	5- 10	2000
Yskökset	5- 10	2000
Kohtuperäiset harjausnäytteet	5- 10	2000

## Sytosentrifugoinnin onnistumiseen vaikuttavat tekijät

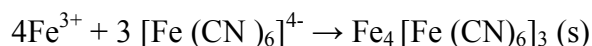
Pelkästään riittävä sytosentrifugaalivoima ja sentrifuugausaika eivät riitä kiinnittämään kappaleita pintaan jota vasten niitä sentrifugoidaan. Tarvitaan myös pinnan ja kappaleiden välinen riittävän suuri adheesio, jotta tarttuminen pintaan tapahtuisi. (Stokes 2004, 436.) Päijät Hämeen sosiaali- ja terveystyöryhmän työohjeessa sytosentrifugivalmistelle ohjeistetaan käyttämään SuperFrost Plus- näytelaseja (PSHOTHEY 2011). SuperFrost Plus- lasien käyttö on hyödyllistä, sillä lasit on käsitelty siten, että niiden pinnalla on pysyvä positiivinen varaus. Tämä varaus auttaa muodostamaan elektrostaattisia- ja kovalenttisia sidoksia näytemateriaalin ja lasin välillä, täten parantaen näytemateriaalin kiinnittymistä. (Thermo Scientific 2012.) Työohjeessa neuvotaan myös lisäämään BAL-huuhteeseen polyetyleeniglykolia (PEG) ennen sytosentrifugointia (PSHOTHEY 2011). PEG:in käyttö on perusteltua, sillä Maxwell ym. tutkimuksessa todetaan polyetyleeniglykolin suojaavan näytteessä olevia proteiineja ja niiden rakennetta (Maxwell, Patterson, Jamison ym. 1999, 141- 143). Sytosentrifugoinnin jälkeen tyhjäyttäessä kyvetistä jossa suspensioliuos on ollut, on varottava liian voimakasta nesteen poistoa kyvetistä. Tämä siksi, koska liian suuren virtausnopeuden tyhjennysvaiheessa on todettu irrottavan partikkeleita näytelasilta (Stokes 2004, 435.)

## 4.2 Rautavärjäys

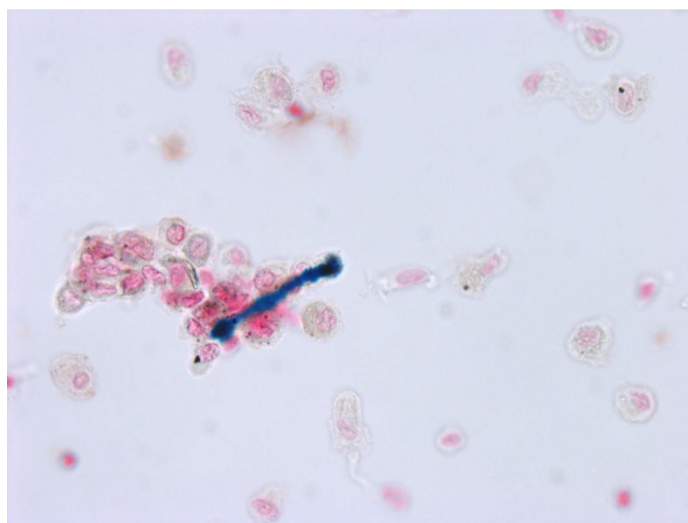
Rautavärjäystä eli Berliininsinivärjäystä (Perls' Prussian blue reaction for ferric iron) pidetään ensimmäisenä histokemiallisena värjäyksenä. Sen kehitti saksalainen patologi Max Perl ja metodista mainittiin ensimmäistä kertaa julkaisussa 1867 (*Nachweis von Eisenoxyd in geweisen Pigmentation*). Värjäyksen periaatteena on tuoda esiin näytteen (kudos- tai irtosolunäyte) proteiinien sisältämä ferrimuotoinen rauta,  $Fe^{3+}$ . Ongelmana on, että elimistössä ferrimuotoinen rauta on voimakkaasti sitoutunut kompleksissa proteiinin rakenteisiin, joten se ei sellaisenaan pysty ottamaan osaa kemiallisiin reaktioihin. (Kiernan 2008, 343; Kettleworth 2007, 90.)

Ratkaisuna tähän ongelmaan on käsitellä näytettä siten, että ferrimuotoinen rauta-ioni irtaantuu proteiineista johon se on sitoutunut, ja on tässä tilassa vapaa reagoimaan. Proteiineista irrottaminen tapahtuu käsittelemällä näytettä laimealla mineraalihanalla, yleensä HCl:llä (suolahappo). Happokäsittely tapahtuu ferrosyanidiliuoksella, joka sisältää 2%

HCl- liuosta, sekä 1% kaliumferrosyanidi- liuosta. Kaliumferrosyanidi reagoi vapaan  $\text{Fe}^{3+}$  - ionin kanssa seuraavasti:

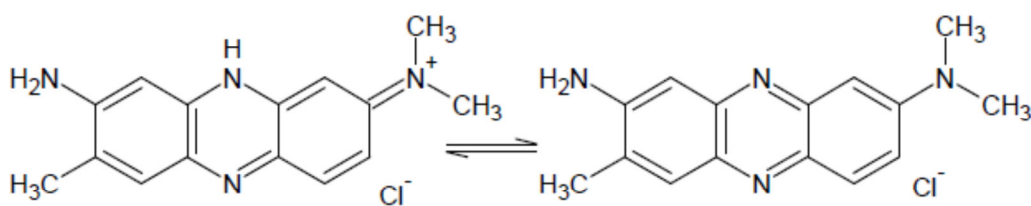


Tätä kutsutaan Perl:in reaktioksi, ja tuloksena syntyvää sinistä yhdistettä on nimeltään ferriferrosyanidi (Preussin, eli Berliininsininen). (Kiernan 2008, 343; Bancroft & Gamble 2002, 245.)



KUVA 2. Rautavärjätty asbestikappale, 400 x suurennos (Keituri 2012)

Asbestikappaleiden värjäytyminen rautavärjäyksellä perustuu asbestikappaleita ympäröivän rauta-proteiini-mykopolysakkaridi -kapselin (asbestos body), rautaionien osoittamiseen (kuva 2). Rautavärjäys värjää kaiken näytteessä olevan, tai näytteeseen ulkopuolelta kulkeutuneen raudan. Tästä johtuen on erittäin tärkeää käyttää rautavapaita välineitä ja astioita värjäysprosessin aikana. Positiivisen kontrollin avulla voidaan helposti havaita värjäyksen onnistuminen. Värjäystulosta voidaan vielä korostaa suorittamalla taustavärjäys Neutral red: llä (Basic red 5), jolloin rautaa sisältävät partikkelit sinisenä erottuvat hyvin punaista taustaa vasten. Neutral red (kuva 3) on kationinen väri, eli se ionisoituu vesiliuoksessa positiiviseen varauksen omaavaksi ioniksi. Tämä tapahtuu vesimolekyylin irrottaessa Neutral red: iin kiinnittyneen kloori- ionin ( $\text{Cl}^-$ ). Tämän jälkeen Neutral red muodostaa ionisidoksen näytteessä olevien negatiivisesti varautuneiden molekyylien kanssa.



KUVA 3. Neutral red rakennekaava. Kaksi eri muotoa, jotka ovat liuoksessa tasapainossa keskenään (mukaillen, Kiernan 2008, 142)

Tällaisia negatiivisesti varautuneita alueita ovat solun tuman nukleiinihappojen fosfaattiryhmät, eräiden makromolekyylisten hiilihydraattien sulfaattiryhmät, sekä hiilihydraattien ja proteiinien karboksylaatti-ionit. (Kiernan 2008, 142-143; Roggli 2004, 35-36; Horobin & Bancroft 2000, 160-161.) Koko rautavärjäysprosessi on syytä suorittaa huoneenlämmössä, sillä vaikka korotettu lämpötila (56°C) voimistaa Perl'in reaktiota, se saattaa Bancroft & Cook: in mukaan johtaa väärin positivisiin värjäystuloksiin (Bancroft & Cook 1994, 208).

### 4.3 Suodatinmenetelmä

Suodatinmenetelmän periaate on konsentroida näyte jossa irralliset solut on kerätty suhteellisen suureen nestetilavuuteen. Tämä tapahtuu suodattamalla näyte membraanifiltterin läpi hyödyntäen joko yli- tai alipainetta. Membraanifiltterin keksi professori Sigmond y vuonna 1935 Göttingenin yliopistossa Saksassa. Ensimmäinen käyttökohde oli puhtaan juomaveden tuottaminen. Vuonna 1953 membraanifiltteriteknologia vapautui kaupalliseen käyttöön, jolloin uusia käyttö sovelluksia alkoi kehittyä mm. lääketeollisuudelle, elintarviketeollisuuteen, kemianteollisuuteen ja sairaaloille. (Woods & Ellis 1994, 10.1- 15; Millipore 2012)

Membraanifiltterin huokokset ovat riittävän suuria jotta neste pääsee läpi, mutta solut jäävät kiinni filtterille. Riittävän pieni huokoskoko sytologisille näytteille on 5µm. Kyseiset filtterit ovat yleensä rakenteeltaan joko selluloosa- asetaattia, tai polykarbonaattia. Käytetty valmistusmateriaali asettaa rajoituksia liittyen mahdollisiin näytteen värjäysmenetelmiin, sillä selluloosa-asetatti ja polykarbonaatti sietävät eri tavoin eri värjäyksissä käytettäviä kemikaaleja. Nämä membraanifiltterit voidaan jakaa neljään eri luokkaan niiden suodatuskyvyn mukaan. Luokat ovat mikrofiltterit, ultrafiltterit, nanofiltterit

ja käänteisosmoosifiltterit. Sytologisille näytteille soveltuvat filtterit kuuluvat mikrofilttereihin. Ultrafiltterit toimivat samaan tapaan kuin sytologiassa käytetyt mikrofiltterit, mutta ne suodattavat huomattavasti pienempiä partikkeleja (n. 0,001-0,01  $\mu\text{m}$ ). Nanofiltterit suodattavat alle 1500 Daltonin painoisia molekyylejä. Käänteisosmoosi on suunniteltu erottamaan ionit jotka ovat kiinni toisissaan. (Woods & Ellis 1994, 10.1-15; Millipore 2012)

Suodatinmenetelmää varten tulee koota erillinen suodatuslaitteisto, joka koostuu alipaineen tuottavasta laitteistosta, imupullosta, sintteristä ja sen tiivisteestä, suppilosta, suodossmassan leviämisen estävästä rajoittimesta, pihdeistä, imupullon ja alipainelaitteiston yhdistävästä letkustosta sekä tietenkin itse Millipore-suodattimesta. Laitteiston kokoaminen tapahtuu seuraavasti: imupullo liitetään alipainelaitteistoon, sintteri tiivisteineen kiinnitetään imupulloon. Tämän jälkeen sintterin pinta kostutetaan 50 % etanolilla ja sille asetetaan Millipore-filtteri. Sintteri- Millipore-suodatin yhdistelmän päälle kiinnitetään pihdeillä suppilo ja suppiloon asetetaan, näyttemateriaalista riippuen, suodatettavan liuoksen rajoitin. Nyt suodatinlaitteisto on valmis käyttöä varten (kuva 4). (Woods & Ellis 1994, 10.1-15; PHSOTEY 2010.)



KUVA 4. Millipore-suodatinlaitteisto koottuna. Kuvassa näkyy imupullo, suppilo, klipsisit, sekä imupullon alipainelaitteistoon yhdistävä letku (Kannisto 2012)

Laitteistoa käytettäessä alipainelaitteisto tuottaa imupulloon niitä yhdistävän letkuston välityksellä alipaineen. Tämä alipaineen voimasta suppiloon kaadettu näyttemateriaali kulkeutuu Millipore-suodattimen kautta imupulloon, josta se voidaan tarvittaessa ottaa talteen. Millipore-suodattimen pinnalle suodatuu näin näyteliuoksen sisältämät kiinteät

partikkelit. Suodatin nostetaan pois sintteriltä ja kiinnitetään klipseillä objektilasille. Tämän jälkeen objektilasi- Millipore-suodatin yhdistelmä siirretään värjättäväksi halutulla menetelmällä. (PHSOTEY 2010.)

#### 4.4 Papanicolaou- värjäys

Papanicolaou -tekniikka on ollut käytössä jo vuodesta 1942, eli kyseessä on melko vanha tekniikka, joka on edelleen yleisessä käytössä maailmanlaajuisesti. Eniten Papanicolaou-tekniikkaa on käytetty gynekologisten irtosolunäytteiden diagnostiikassa, mutta sillä on sovelluksia muidenkin sytologisten näytteiden tutkimuksissa. (Boon & Suurmeier 1996, 257.) Näitä muita näytteitä ovat mm. yskökset, bronkoalveolaariset huuhteet, virtsa, pleuraneste ja perikardiaalineneste (Bibbo 1997, 892).

Papanicolaou- värjäyksestä ei ole olemassa vain yhtä ”oikeaa” versiota, vaan menetelmästä on monia eri sovelluksia, jotka kuitenkin perusperiaatteiltaan noudattavat samoja linjoja (Boon & Suurmeier 1996, 257). Näiden eri sovellusten erot voidaan kuitenkin havaita värjäyksen lopputuloksesta. Myös värjättävä näytemateriaali vaikuttaa siihen miten Papanicolaou- värjäys suoritetaan; värjäysliuokset ja värjäysajat vaihtelevat riippuen värjätäänkö sivelynäytteitä vai selluloosafilttereille konsentroituja näytteitä. (Bibbo 1997, 892.)

Tuma tuodaan esiin Papanicolaou -värjäyksessä esiin suorittamalla sen värjäys hematoksyliinillä. Hematoksyliinin erikoisuus on, että sen värjäävä aine hemateiini on negatiivisesti varautunut, samoin kuin DNA:kin. Näiden kahden negatiivisesti varautuneen yhdisteen sitoutuminen olisi mahdottomuus, ellei hematoksyliini sisältäisi alumiinisulfaattia. Alumiinisulfaatti toimii värjäyksessä positiivisesti varautuneena ionina, ja muodostaa sillan hemateiinin ja DNA:n välille (fosforihappo-osa). Tuma värjäytyy tumman eri sävyihin. (Aho 2000, 145; Bibbo 1997, 89.)

Papanicolaou- tekniikassa käytetään solun sytoplasman värjäämiseen kahta tai kolmea hapanta väriä, menetelmästä riippuen. Nämä happamat värit ovat Light Green SF, Eosin Y ja Orange G. (Horobin & Bancroft 2000, 150.) Light Green värjää mm. aineenvaihdunnallisesti aktiiviset solut, lieriösolut ja adenokarsinooman solut vihreiksi. Lisäksi Light Green sitoutuu hyvin proteiinien perusrakenteisiin. Eosiini Y värjää punasolut,

värekarvat ja levyepiteelin pintasolut punaisiksi. Orange G värjää proteiineja, etenkin keratiinia. Nimensä mukaan Orange G:n värjää nämä kirkkaan oransseiksi. (Aho 2000, 145; Bibbo 1997, 897 – 899.)

Sytoplasmavärejä käytetään värjäyksessä siten, että Eosiini Y ja Light Green ovat samassa liuoksessa. Tästä liuoksesta käytetään yleensä lyhennettä EA-liuos (joskus tämä lios sisältää myös Bismarck Brown Y:tä) Orange G on taas oma liuoksensa, samoin kuten hematoksyliinikin. (Bibbo 1997, 897- 899.)

Itse värjäysprosessi jaetaan kolmeen vaiheeseen; tumavärjäys, ensimmäinen sytoplasmavärjäys ja toinen sytoplasmavärjäys. Värjäysjärjestys on siis seuraavanlainen:

Hematoksyliini → EA väri → Orange G

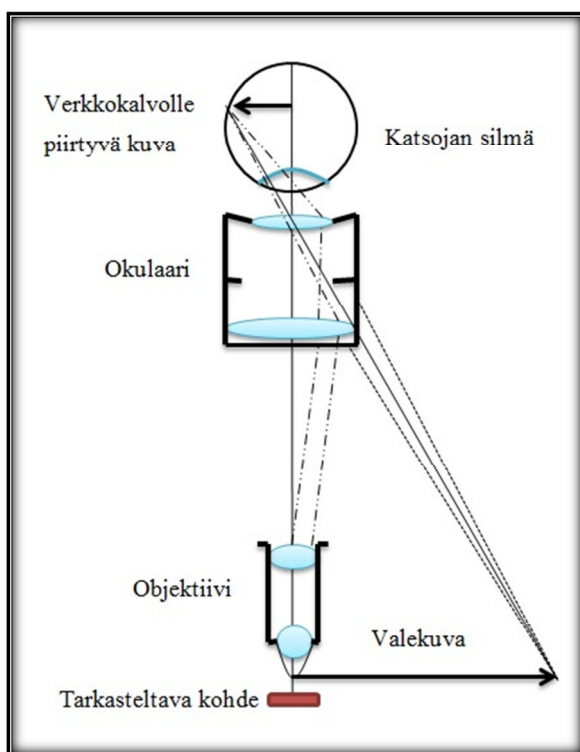
Vaikkakin itse värjäyksestä on siis olemassa moni eri versioita, voidaan jokainen sovel-  
lus laskea kuuluvan jompaankumpaan kahdesta erilaisesta Papanicolaou- tekniikan ver-  
sioista. Nämä versiot ovat Progressiivinen metodi ja Regressiivinen metodi. Taulukossa  
4 on esitelty näiden kahden eri metodin vertailu. Progressiivisessa metodissa tumaa vär-  
jätään hematoksyliinillä vain sen verran, että saavutetaan toivottu värjäytymisaste. Sy-  
toplasma värjätään siten, että se juuri sävyttyy. Regressiivisessä metodissa taasen tumal-  
le suoritetaan pidempi värjäys hapattamattomalla hematoksyliinillä, jolloin tuma rajusti  
ylivärjäytyy. Tämän jälkeen näytettä pestään suolahapolla niin kauan, että saavutetaan  
toivottu värjäytymisen aste. (Aho 2000, 143; Bibbo 1997, 893- 894.)

TAULUKKO 4. Progressiivisen ja regressiivisen Papanicolaou- värjäyksen vertailu. (mukaillen, Bibbo 1997, 893).

Värjäyksen työvaiheet	Papanicolaou – värjäyksen suoritus		
	Progressiivinen metodi	Yhteistä	Regressiivinen metodi
Fiksaatio		95% etanoli tai vastaava	
Pesu päällysteen poistamiseksi (sivelyvalmisteet)		95% etanoli spray – fiksatiivin poistoon	
Tumavärjäys (DNA)	(Värjätään haluttuun voimakkuuteen)	Hematoksyliini	(Ylivärjätään)
Pesu	Vesi		
Sinistys tai hematoksyliinin poisto	Ammonium hydroksidi, Litiumkarbonaatti, Scott'in hanaveden korvike (pH 8,02), 0,5% Natriumasetaatti (pH 7,13), 1,0% Kaliumasetaatti (pH 7,45) tai 0,1% Natriumbikarbonaatti (pH 8,05)		Huuhtelu 0,05%, 0,5% tai 5% HCl – liuoksessa
Pesu suolan muodostumisen ehkäisemiseksi tai hapon toiminnan lopettamiseksi		Vesi	
Dehydraatio		95% etanoli	
Sytolasman värjäys		Orange G	
Pesu		95% etanoli	
Sytolasminen ja nukleolaarinen värjäys (RNA)		EA polykrominen väri	
Pesu		95% etanoli	
Dehydraatio		ABS (puhdas etanoli)	
Kirkastus		ABS / Ksyleeni	
Kiinnitys		Soveltuva kiinnitysaine	

#### 4.5 Asbestin kvantitointi

Asbestin kvantitointi suoritetaan laskemalla asbestikappaleiden määrä BAL- huuhteessa, tämä tapahtuu selvittämällä asbestikappaleiden määrä tutkimukseen käytetyn BAL- huuhteen tilavuudessa, määrä/ml (Fimlab 2012a). Asbestikappaleiden määrä BAL- valmisteesta lasketaan valomikroskooppia käyttäen (Karjalainen ym. 1996, 1001). Koko näytelasin näytettä sisältävä alue mikroskopoidaan ja löydettyjen asbestikappaleiden määrä kirjataan ylös. Löydettyjen asbestikappaleiden määrä jaetaan näytelasin valmistukseen käytetyn fiksoimattoman BAL- huuhteen määrällä, jolloin saadaan vastaus muodossa asbestikappaletta/ml (Fimlab 2012a). Tähän asbestikappaleiden tunnistamiseen käytettävä mikroskooppi, kuten kaikki muutkin nykyiset mikroskoopit, on yhdistelmämikroskooppi (compound microscope) (kuva 5).



KUVA 5. Yhdistelmämikroskoopin toimintaperiaate, objektiivi- ja okulaarisuurennos (mukaillen Bartels 1993, 400).

Yhdistelmämikroskoopin periaatteen kehitti ja toteutti Erns Abbe 1827 yhdessä Carl-Zeissin kanssa 1827. Yksinkertaistettuna laitteen toiminnasta voidaan todeta, että se käyttää tarkasteltavan kohteen suurennoksessa objektiivi- ja okulaarisuurennoksien keskenään kerrottua tuloa, jolloin esimerkiksi 40 x objektiivilla ja 10 x okulaarilla saadaan 400 kertainen suurennos. (Bartels 1993, 397- 398; Rantala & Lounatmaa 1998, 9-11.)

## **5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE, TEHTÄVÄ JA TUTKIMUSONGELMA**

Opinnäytetyön tarkoitus on verrata sytosentrifugitekniikalla valmistettuja rautavärjättyjä asbesti- BAL- valmisteita, suodatinmenetelmällä valmistettuihin Papanicolaou- värjättyihin asbesti- BAL- valmisteisiin. Vertailusta saatujen tuloksien perusteella valitsemme käytetyistä tekniikoista toisen, joka on soveltuvampi asbesti- BAL- valmisteelle. Tästä tutkimuksesta saatavaa tietoa Päijät- Hämeen sosiaali- ja terveysyhtymä voi hyödyntää asbestoosin diagnostiikan parantamisessa.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa sytosentrifugivalmistetun rautavärjätyn ja suodatinmenetelmällä tehdyn Papanicolaou- värjätyn asbesti- BAL- valmisteen eroavaisuuksista, sekä valita näistä tekniikoista toinen, joka on asbestoosin diagnostiikkaan soveltuvampi.

Opinnäytetyön tehtävä on kokeellisesti selvittää, kumpi asbesti- BAL- valmisteiden valmistamiseen käytetyistä menetelmistä on soveltuvampi, sekä asbestipartikkeleiden määrän osoittamiseen, että paremman asbestikappaleiden värjäytymistuloksen aikaansaamiseen bronkoalveolaarisesta lavaatiohuuhteesta.

Opinnäytetyön tutkimusongelma on, miten rauta- ja Papanicolaou- värjätty asbestikappaleet erottuvat asbesti- BAL- valmisteesta, sekä kuinka paljon asbestikappaleita (kpl/ml) löytyy sytosentrifugoidusta ja rautavärjätystä bronkoalveolaarisesta lavaatiovalmisteesta, verrattuna Papanicolaou- värjättyyn Millipore- suodosvalmisteeseen.

## 6 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Tieteellinen tutkimus on ongelmanratkaisua, joka pyrkii selvittämään tutkimuskohteen lainalaisuuksia ja toimintaperiaatteita. Tutkimukset ovat joko valmiiseen tietomateriaaliin pohjautuvaa teoreettista tutkimusta, tai havainnointiin perustuvaa empiiristä tutkimusta. Empiirinen tutkimus taas puolestaan jakautuu kvantitatiiviseen, eli määrällisiin tutkimuksiin ja kvalitatiiviseen, eli laadullisiin tutkimuksiin. (Heikkilä 2008, 13-14.) Opinnäytetyö on empiirinen tutkimus jonka tutkimusmenetelmänä on kvantitatiivinen, eli määrällinen tutkimus.

Opinnäytetyö on kokeellinen ja vertaileva tutkimus. Kokeellisella tutkimusmenetelmällä tarkoitetaan menetelmää, jolla seurataan ja tutkitaan jonkin ilmiön reaktiota johonkin tai vaikutusta johonkin. Kokeellisen aselman on tarkoitus keskittyä tähän ilmiöön. Tällainen tutkimus on systemaattista ja kontrolloitua tiedon keruuta, käyttäen apuna tutkimukseen soveltuvia tieteellisiä instrumentteja ja menetelmiä. (Anttila 2005, 183-185.) Kokeelliseen tutkimukseen voidaan sisällyttää vertaileva tutkimus. Vertailussa on tarkoitus saada selville usean vertailtavan tekijän suuruus-, paremmuus- tai jokin vastaava looginen järjestys. (Aaltola & Valli 2007,139). Opinnäytetyössä vertailtavana suurena käytetään eri värjäysmenetelmien kykyä tuoda esiin asbestipartikkelit tutkimusaineistona käytetyistä asbesti-BAL-näytteistä. Koska tutkimusmateriaalina käytetään potilasnäytteitä, on opinnäytetyössä noudatettu hyvää tieteellistä käytäntöä ja varmistettu tutkimusaineiston anonymisointi.

## 7 TUTKIMUKSEN SUORITUS

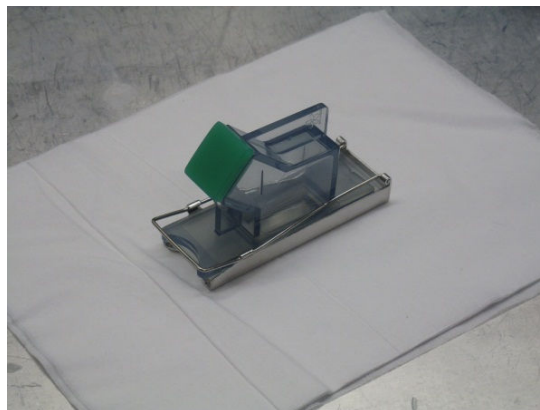
### 7.1 Rautavärjäyksen suoritus

Kokeellinen tutkimus suoritettiin Päijät-Hämeen keskussairaalan patologian laboratorion tiloissa 25.4- 26.4.2012. Tutkimusluvan myönsi ylihoitaja Leena Savolainen 16.2.2012. Tutkimusmateriaalina käytettiin BAL- näytteitä, joita oli kerätty ennalta tammi- huhtikuun 2012 välisenä aikana. Tätä tutkittavaa materiaalia oli tuona aikana kertynyt viisi BAL- näytettä. Näistä näytteistä oli Päijät- Hämeen keskussairaalan patologian laboratorio jo ennalta tehnyt Papanicolaou- värjätyt suodatinvalmisteet. Kustakin BAL- näytteestä oli omaa tutkimustamme varten säästetty noin 10ml tutkittavaa materiaalia. Jokaisesta näytteestä tehtiin sytosentrifugivalmiste, ja jokaiselle sytosentrifugivalmistelle suoritettiin rautavärjäys. Värjäyksen jälkeen voitiin vertailla mikroskopimalla rautavärjätyin sytosentrifugivalmisteen ja Papanicolaou- värjätyin suodosvalmisteen kykyä tuoda esiin asbestikappaleet BAL- näytteestä.

Sytosentrifugivalmisteen teko aloitettiin kokoamalla kyvetti BAL- näytteelle. Tämä kyvetti rakentui muovisesta rungosta, kyvetin kumikorkista, tiivisteestä, SuperFrost Plus-objektilasista sekä metallisesta pidikeosasta. Valmiiksi koottuun kyvettiin pipetoitiin ensin 0,5ml polyetyleeniglykolia (PEG), tämän jälkeen kyvettiin annosteltiin 10ml ruiskulla näytemateriaalia 10ml. Tämän jälkeen kyvetti täytettiin siinä olevaan merkki- viivaan asti 50% etanoliliuoksella ja suljettiin kumikorkilla.



KUVA 6. Kyvetin osat (Keituri 2012)



KUVA 7. Koottu kyvetti (Keituri 2012)

Kootut kyvetit näytemateriaaleineen asetettiin sytosentrifugin roottoriin siten, että roottori oli tasapainotettu. Tätä varten piti lisätä ylimääräinen kyveti, jotta joka kyvetille olisi vastinpari. Roottori kyvetteineen asetettiin Sakura Cyto- Tek sytosentrifugiin. Laite käynnistettiin työohjeen mukaisilla asetuksilla siten, että sentrifugointiaika oli viisi minuuttia ja kierrosnopeus 1000 kierrosta minuutissa.



KUVA 8. Sakura Cyto- Tek sytosentrifugi (Kannisto 2012)

Sentriugauksen jälkeen kyvetit poistettiin roottorista, ylimääräinen neste (supernatantti) kaadettiin pois ja kyveti jätettiin hetkeksi ”valumaan”. Tämän jälkeen kyveti purettiin ja objektilasi otettiin talteen, varoen koskemasta alueeseen jolle BAL- näytteen kiinteät partikkelit olivat kiinnittyneet. Objektilasit asetettiin Memmert- lämpökaappiin 37°C yön yli lopullisesti kiinnittymään.

Seuraavan päivänä objektilasit poistettiin lämpökaapista ja kuivuneita laseja silmämääräisesti tutkimalla voitiin todeta niihin kiinnittyneen näytemateriaalia rajaajan määrittämälle alueelle. Objektilasien todettiin olevan valmiina rautavärjäystä varten.



KUVA 9. Näytelasit valmiina rautavärjäykseen (Keituri 2012)

Rautavärjäyksen onnistumisen seuraamiseksi, näytteiden mukaan otettiin myös kontrollinäyte; tässä tapauksessa näytelasille kiinnitetty histologinen maksakudosleike, jonka tiedettiin sisältävän rautaa. Ennen värjäysprosessin aloittamista tästä kontrollinäytteestä tuli poistaa parafiini deparanifisoinnilla ja palauttaa vesi näytteeseen, jotta värjäytyminen olisi mahdollista. Tämä tapahtui Leica ST 5020 värjäysautomaatilla, käyttäen valmiiksi ohjelmoitua parafiininpoisto-ohjelmaa.

Rautavärjäys suoritettiin yksinkertaisuutensa ja nopeutensa johdosta manuaalisesti vetokaapissa käyttäen astioita ja työvälineitä, jotka eivät sisältäneet rautaa. Rautavapaita välineitä käytettiin siitä syystä, että ulkopuolelta tuleva rauta saattaa kontaminoida näytteen ja vääristää värjäystulosta. Värjäystä varten varattiin seuraavia reagensseja: Perlin reagenssi varten perusliuos A: ta ja perusliuos B: tä, tislattua vettä, sekä 0,1 % neutraalipunaluosta. Perusliuos A sisälsi 20g kaliumhexasyanoferraattia (II) (Merck 104984) liuotettuna 500ml tislattua vettä. Perusliuos B sisälsi 65ml 37 % HCl-liuosta (Merck 1.00317) joka oli täydennetty 500ml tislattulla vedellä. Neutraalipunaluos sisälsi 0,1g neutralrot- jauhetta (Merck 101369) joka oli liuotettu 100ml tislattua vettä. Näitä kaikkia liuoksia oli valmiiksi tehtynä laboratorion reagenssikaapissa.

Värjäysprosessi aloitettiin muodostamalla rautavapaista astioista linjasto, jota pitkin näytelaseja kuljetettiin värjäyksen edetessä. Linjaston järjestys oli seuraava:

Tislattu vesi → Perlin reagenssi → Tislattu vesi → 0,1 % neutraalipuna → Tislattu vesi

Perlin reagenssi siis muodostettiin yhdistämällä yhtä suuret tilavuudet Perusliuos A:ta ja Perusliuos B:tä, tässä tapauksessa 40ml kumpaakin. Tämä siksi koska joutuessaan hapon kanssa tekemisiin, kaliumhexasyanoferraati muodostaa myrkyllistä syaanivetyä.

Värjäyksen ensimmäinen askel oli kastaa näytelaseja 6-10 kertaa tislatussa vedessä, jolloin tapahtui näyttemateriaalin rehydraatio. Tämän jälkeen lasit siirrettiin Perlin reagenssia sisältävään astiaan 20 minuutiksi, minkä aikana näyttemateriaalin sisältämä rauta reagoi Perl: in reaktion mukaisesti, muodostaen sinistä ferriferrosyanidia. Seuraava vaihe oli jälleen 6- 10 kastoa tislatussa vedessä. Tämä vaihe oli tärkeä ylimääräisen Perlin reagenssin poistamiseksi, sillä värjäyksen seuraavassa vaiheessa jäämät reagenssia aiheuttaisivat saostumia näytteeseen ja näin ollen hankaloittaisivat värjäystuloksen tulointa. Tämän tislattuun veteen kaston jälkeen ei enää ollut tarvetta käyttää rautavapaita välineitä, joten lasit siirrettiin metalliseen kuljetuskelkkaan. Tässä kelkassa suoritettiin taustan värjäys pitämällä lasia kaksi minuuttia neutraalipunaluoksessa. Tämän kahden minuutin aikana näytteen negatiivisesti varautuneet osat värjäytyivät punaisella. Lopuksi suoritettiin huuhtelua tislatussa vedessä, ja kelkka lasineen jätettiin hetkeksi valumaan.



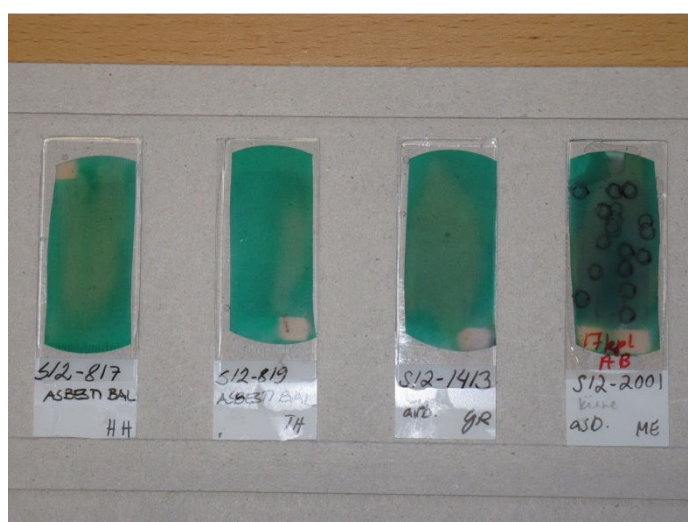
KUVA 10. Rautavärjäyspiste. Värjäysastiat vasemmalta oikealle: tislattu vesi, Perlin reagenssi (perusliuos A 40ml + perusliuos B 40ml), tislattu vesi ja neutraalipunaluuos (Kannisto 2012)

Värjäyksen suorittamisen jälkeen näytelaseista tuli poistaa vesi ja ne päällystettiin värjäystuloksen säilymisen varmistamiseksi. Veden poisto suoritettiin manuaalisesti nousevassa alkoholisarjassa, joka päättyi ksyleeniin. Nousevalla alkoholisarjalla tarkoitetaan, että kelkassa olevat näytelasit käsiteltiin seuraavasti: 96 % alkoholi (3 astiaa, jokaisessa 10 kastoa), absoluuttinen alkoholi (3 astiaa, jokaisessa 10 kastoa) ja lopuksi ksyleeni (3 astiaa, jokaisessa 10 kastoa). Ksyleenin annettiin hetken aikaa haihtua näytelaseista ennen päällystysautomaattiin siirtämistä. Päällystysautomaatissa rautavärjätty-

jen näytelasien päälle kiinnitettiin peitinkalvo, joka mahdollisti värjäystuloksen pitkäaikaisen säilymisen. Käytetty päällystysautomaatti oli Tissue - Tek® SCA. Päällystysksen jälkeen rautavärjätty asbesti- BAL- lasit ja positiivinen kontrolli olivat valmiita mikroskopiointia varten.

## 7.2 Mikroskopiointi

Kokeellisen tutkimuksen ensimmäisenä päivänä, heti BAL- näytteistä tehtyjen sytosentrifugivalmisteiden valmistamisen jälkeen, siirryttiin mikroskopoimaan samoista BAL- näytteistä laboratorion henkilöstön jo ennalta valmistamia Papanicolaou- värjättyjä asbesti- BAL- Millipore suodoksia. Mikroskopiointin tarkoituksena oli löytää suodatinvalmisteen sisältämät asbestipartikkelit. Tämä tehtiin, koska näin saatiin vertailupohjaa tuleville rautavärjättyille asbesti- BAL- näytteille, ja samalla pystyttiin vertaamaan itse laskettuja asbestipartikkeleiden määrää esitarkastajien laskemiin ja vastaamiin määriin. Samalla kuvattiin mikroskooppikameralla muutamia Papanicolaou- värjättyjä asbestikappaleita, jotta mikroskooppinäköä voitaisiin myöhemmin verrata vastaaviin rautavärjättyihin asbestikappaleisiin.



KUVA 11. Papanicolaou-värjättyjä asbesti-BAL-Millipore suodoksia objektilaseilla (Keituri 2012)

Kokeellisen tutkimuksen toisena päivänä suoritettiin rautavärjättyjen asbesti- BAL- näytteiden mikroskopiointi. Tämä tapahtui noudattaen samoja työvaiheita kuin Papanicolaou- värjättyjen asbestikappaleiden tarkastelu. Ensin mikroskopoimalla varmis-

tuttiin värjäyksen onnistumisesta tarkastamalla positiivisena kontrollina toiminut maksaleike. Värjäys todettiin onnistuneeksi ja siirryttiin mikroskopoimaan asbestikappaleita. Rautavärjäytyneiden asbestikappaleiden määrä näytettä kohden laskettiin kappaleita/käytetty näytemäärä. Jokaisesta näytteenä toimineesta BAL-näytteestä, josta löytyi asbestikappaleita Papanicolaou - värjäyksellä, löytyi asbestikappaleita myös rautavärjäyksellä. Löydösten määrä molemmilla tekniikoilla oli vastaavalla tasolla merkitsevä. Rautavärjättyjä asbestikappaleita kuvattiin myös mikroskooppikameralla, jotta värjäystuloksen vertaaminen Papanicolaou- värjäykseen olisi jälkeinpäin mahdollista.

## 8 TUTKIMUSTULOKSET, POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

### 8.1 Tulokset

Rautavärjättyjä asbestikappaleita tarkasteltaessa voitiin todeta värjäyksen onnistuneen. Asbestipartikkelit erottuivat selvästi kirkkaansinisinä sauvamaisina kappaleina ja taustan muiden partikkeleiden värjäntyminen punaisella Neutral red:llä korosti sinistä väriä (Liite 1, 2 ja 3). Tämä oli selvin eroavaisuus Papanicolaou- värjättyihin asbestikappaleihin verrattuna, sillä harjaantumattomaan silmään niiden havaitseminen tasaisen vihertävästä taustasta oli huomattavasti vaikeampaa (Liite 4).

Asbestipartikkelien määrä laskettiin määrityksellä kappaleita millilitrassa. Taulukossa 5 on eritelty rautavärjyksellä ja Papanicolaou- värjyksellä löytyneiden asbestipartikkelien määrät BAL- näytteissä. Tällöin havaittiin tuloksissa pientä hajontaa rauta- ja Papanicolaou- värjäysten välillä. Näytteissä 1 ja 4 Papanicolaou- värjättyltä Millipore- suodokselta löytyi useampi asbestipartikkeli, kun taas näytteestä 3 rautavärjäys toi esiin enemmän asbestipartikkeleja.

TAULUKKO 5. Valomikroskoopilla havaittujen asbestipartikkelien määrät rauta- ja Papanicolaou- värjättyissä asbesti- BAL- valmisteissa.

Näytenumero	Rautavärjyksellä löydettyt asbestipartikkelit, kpl/ml	Papanicolaou- värjyksellä löydettyt asbestipartikkelit, kpl/ml
Näyte 1	0,3	0,8
Näyte 2	0	0
Näyte 3	1,8	1,0
Näyte 4	0,9	2
Näyte 5	0	0

## 8.2 Pohdinta ja johtopäätökset

Opinnäytetyön tarkoitus oli suorittaa rautavärjäys bronkoalveolaariselle lavaationäytteelle ja suorittaa myös Papanicolaou- värjäys, käyttäen samoja näyttemateriaaleja kumpaankin värjäykseen. Näyttemateriaalin niukkuuden vuoksi ei kuitenkaan voitu suorittaa useampia rinnakkaisia värjäyksiä, joten Papanicolaou-värjäysten osalta oli turvauduttava laboratorion henkilökunnan aikaisemmin suorittamiin värjäyksiin. Näiden kahden värjäyksen tuloksia verrattiin sitten keskenään. Rautavärjäys onnistui hyvin ja sen avulla saatiin hyvin tuotua esille BAL- huuhteen sisältämät asbestipartikkelit.

Rautavärjättyjä ja Papanicolaou- värjättyjä asbestipartikkeleja vertailtaessa, tämän opinnäytetyön tekijät tulivat siihen tulokseen, että rautavärjätty asbestipartikkelit oli huomattavasti helpompi löytää ja tunnistaa mikroskopoitaessa. Tämän lisäksi työprosessi, jolla rautavärjäys suoritettiin, oli yksinkertainen ja nopea. Tästä johtuen värjäyksen suoritus onnistui helposti työohjetta seuraamalla. Papanicolaou- värjäys asbestipartikkeleille olisi ollut kestoltaan pidempi ja työvaiheiltaan monimutkaisempi. Ainakin yhdestä Papanicolaou-värjätystä objektilasista oli säilytyksen aikana irronnut päällystinkalvo. Tämä johtui luultavasti suodosvalmisteesta käytetystä Millipore-suodatinpaperista. Tätä ei todennäköisesti tapahtuisi rautavärjättyille lasille, joissa ei kyseistä suodatinpaperia käytetä.

Ainoa rautavärjäyksen selkeyttä jossain määrin haittaava tekijä tuli ilmi kun BAL- näyte sisälsi runsaasti siderofageja. Siderofagit ovat erytrosyytin fagosytoineita makrofageja joiden sisään on jäänyt erytrosyytin sisältämää hemosideriiniä (Carr & Rodak 2009, 23) (Liite 1. 2(2)). Tällöin asbestikappaleiden havainnointi saattoi hieman hankaloitua, kaikkien näytteen ferrimuotoista rautaa sisältävien solujen värjäytyessä myös sinisiksi, eli samalla värillä kuin asbestibodytkin.

Tarkasteltaessa BAL- näytteestä löydettyjen asbestipartikkeleiden määrää, joissain tapauksissa Papanicolaou- värjätystä suodosvalmisteesta löytyi enemmän näitä partikkeleita kuin rautavärjätystä sytosentrifugivalmisteesta. Tämä saattoi johtua useastakin eri tekijästä. Asbestipartikkelit saattoivat olla epätasaisesti jakautuneet BAL- huuhteessa, johtuen esimerkiksi fiksoidun näytteen huonosta sekoituksesta. Näytteissä 1, 3, 4 ja 5, BAL- huuhdetta oli rautavärjäystä varten säästynyt hieman vähemmän kuin työohjeessa säädetty määrä eli 10 ml. Tämä yhdessä mahdollisen huonon sekoituksen kanssa saat-

taisi selittää eriävät tulokset värjäystekniikoiden välillä. On myös mahdollista, että rautavärjäykseen käytettävien sytosentrifugivalmisteiden työohje vaatisi korjaamista. Sytosentrifugoitaessa käytettyä kierrosnopeutta nostamalla kenties useampi asbestipartikkeli olisi kiinnittynyt näytelasiin suuremmasta sentrifugaalivoimasta johtuen. Nyt ei voida olla täysin varmoja, oliko pois kaadetun supernatantin joukossa vielä kiinnittymättömiä asbestipartikkeleja. Rauta- ja Papanicolaou- värjättyjä valmisteita vertailtaessa on myös huomioitava se, että Papanicolaou- värjäykset suoritti kokeneempi henkilöstö, kun taas rautavärjäykset olivat opiskelijoiden tekemiä. Tämän lisäksi suurempaa otosta käyttämällä olisi voitu tehdä tilastollisia analyysejä, joiden avulla nyt havaittu tulosten hajonta olisi mahdollisesti tasaantunut.

Kuten edeltäneessä kappaleessa todettiin, tarkoituksena oli alun perin kerätä laajempi otos kuin nyt oli mahdollista. Vielä vuonna 2010 Päijät- Hämeen keskussairaalassa suoritettiin 68 asbestin kvantitointia BAL- näytteestä. Tämän jälkeen asbesti- BAL- tutkimuksien määrä on kuitenkin ollut tasaisessa laskussa, mutta tätä tietoa ei ollut saatavilla opinnäytetyötä aloitettaessa. Tästä tutkimusten vähenemisestä johtuen, kevään 2012 aikana Päijät-Hämeen keskussairaalan patologian laboratorion henkilökunnan suorittamasta näytemateriaalin kokoamisesta kertyi vain viisi asbesti- BAL- näytettä. Tästä otoksesta luotettavan tilastollisen analyysin suorittaminen oli valitettavasti mahdotonta, joten värjäysmenetelmien vertailun oli perustuttava mikroskopointitulosten visuaaliseen havainnointiin.

Kumpikin värjäysmenetelmä toi esiin BAL- näytteen sisältämiä asbestipartikkeleja. Tämän lisäksi myös löydetty partikkelimäärät olivat, pientä vaihtelua lukuun ottamatta, samaa kokoluokkaa. Rautavärjätty sytosentrifugivalmiste oli kuitenkin nopeampi ja yksinkertaisempi valmistaa, sekä värjäystuloksen tulkinta oli Papanicolaou- värjäykseen verrattuna selkeämpää. Näistä tekijöistä johtuen, rautavärjäys on näistä kahdesta värjäysmenetelmästä suositeltavampi vaihtoehto.

Kirjallista lähdemateriaalia opinnäytetyölle oli melko runsaasti saatavilla. Tämä johtui siitä, että opinnäytetyössä käsiteltävät tekniikat ja menetelmät ovat olleet tunnettuja histologiassa ja sytologiassa jo kauan. Tämän vuoksi niihin liittyvää kirjallisuutta on myös olemassa melko runsaasti ja juuri tekniikoiden iän perusteella voidaan olettaa, että nykyisin käytössä oleva teoreettinen tietämys aiheesta on oikeaa. Suuressa osassa käytetyssä kirjallisuudessa ei tosin mainittu minkäänlaista vertailua käytettyjen tekniikoiden

ja värjäysmenetelmien välillä. Tästä johtuen opinnäytetyön tekijöiden näkemyksille vertailtavien tekniikoiden ja värjäysmenetelmien paremmuudesta suhteessa toisiinsa ei löydy puoltavaa saati sitten kieltävää näkemystä kirjallisuudesta.

Toivomme tästä opinnäytetyöstä olevan hyötyä Päijät- Hämeen keskussairaalan patologialle heidän tehdessään päätöstä siirtymisessä asbestoosin diagnostiikassa käytettävästä asbestin kvantitointimenetelmässä Papanicolau- värjäyksestä rautavärjäykseen. Jatko-tutkimusideana tälle opinnäytetyölle ehdotamme sytosentrifugoinnissa käytettävien asetusten muutoksien, kuten kierrosnopeuden nostamisen, vaikutusta löydettyjen rautavärjättyjen asbestipartikkelien määrään.

## LÄHTEET

Aaltola, J & Valli, R. 2007. Ikkunoita tutkimusmetodeihin I. Jyväskylä: PS-kustannus.

Aho, K. 2000. Sytologiset värjäykset. Moodi 4-5. Helsinki: LabQuality Oy.

Ammattitaitilaki 29.12.1988/1343. Luettu 11.8.2012.

<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1988/19881343>

Anttila, P. 2005. Ilmaisuu, Teos, Tekeminen ja Tutkiva toiminta. Hamina: Akatiimi Oy.

Asbestos Resource Center. Luettu 29.7.2012.

<http://www.asbestosresource.com/mesothelioma/>

Asetus turvallisuutta asbestin käytössä koskevan yleissopimuksen voimaansaattamisesta. 20.6.1989. Luettu 15.8.2012.

<http://www.finlex.fi/fi/sopimukset/sopsteksti/1989/19890025>

Bancroft, J. & Gamble, M. 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. 5. painos. China: Churchill Livingstone.

Bancroft, J. & Cook, H. 1994 Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application. 2. painos. Singapore: Churchill Livingstone.

Bartels, P, H. 1993. The Manual of Cytotechnology. 7. painos. China. American Society of Clinical Pathologist.

Bibbo, M. 1997. Comprehensive Cytopathology. 2. painos. USA: W. B. Saunders Company.

Boon, M. & Suurmeijer, A. 1996. The Pap Smear. 3.painos. Amsterdam: Harwood Academic Publishers GmbH.

Carr, J. H & Rodak. B. F. 2009. Clinical Hematology Atlas. 3. painos. China: Elsevier Inc.

Centripetal and Centrifugal Force and Acceleration, Centripetal and Centrifugal acceleration - force due to circular motion. The Engineering ToolBox 2012. Luettu 1.7.2012. [http://www.engineeringtoolbox.com/centripetal-acceleration-d\\_1285.html](http://www.engineeringtoolbox.com/centripetal-acceleration-d_1285.html)

Filtration Basics, History of Membranes. Millipore 2012. Luettu 22.8.2012.

[http://www.millipore.com/membrane/flx4/filtration\\_basics\\_hm&tab1=3&tab3=5#tab1=2:tab3=5](http://www.millipore.com/membrane/flx4/filtration_basics_hm&tab1=3&tab3=5#tab1=2:tab3=5)

Filtration Basics, Types of Filtration. Millipore 2012. Luettu 22.8.2012.

[http://www.millipore.com/membrane/flx4/filtration\\_basics\\_hm&tab1=3&tab3=5#tab1=3:tab3=5](http://www.millipore.com/membrane/flx4/filtration_basics_hm&tab1=3&tab3=5#tab1=3:tab3=5)

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012a. Bronkoalveolaarinen huuhtelunäyte, asbestin kvantitoiminen. Laatimispäivämäärä 11.7.2012. Luettu 12.9.2012.  
[http://www.laboratoriokeskus.fi/lake/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu\\_id=194;setid=6570;id=8843](http://www.laboratoriokeskus.fi/lake/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=6570;id=8843)

Fimlab Laboratoriot Oy. 2012b. Bronkoalveolaarinen huuhtelunäyte, solututkimus. Laatimispäivämäärä 11.7.2012. Luettu 17.9.2012.  
[http://www.fimlab.fi/lake/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu\\_id=194;setid=6571;id=8431](http://www.fimlab.fi/lake/ohjekirja/nayta.tmpl?sivu_id=194;setid=6571;id=8431)

Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. 7. uudistettu painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

HUSLAB. 2011. Bronkoalveolaarisen lavaationäytteen sytologinen tutkimus, bronkoalveolaarihuuhtelunesteestä. Päivitetty 9.3.2011. Luettu 17.9.2012.  
[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=3784&terms=bal](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=3784&terms=bal)

Huuskonen, S. Jahkola, A & Oksa, P. 2009. Asbestisairaudet. Duodecimlehti 125: 1667-70.

Horobin, R. & Bancroft, J. 2000. Troubleshooting Histology Stains. 2. painos. UK: Churchill Livingstone.

Johnston, W, W. 1993. The Manual of Cytotechnology. 7. painos. China. American Society of Clinical Pathologist.

Karjalainen, A. Piipari, R. Mäntylä, T. Mönkkönen, M. Nurminen, M. Tukiainen, P, Vanhala, E. & Anttila, S. 1996. Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage in relation to asbestos bodies and asbestos fibres in lung parenchyma. UK: European Respiratory Journal 1000-1005.

Katzenstein, A- L. A. 2006. Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease. 4. painos. China: Saunders Elsevier, Elsevier Inc.

Kettleworth, C. R. 2007. Cell Apoptosis Research Advances. USA, New York. Nova Science Publishers, Inc.

Kiernan, J. 2008. Histological & Histochemical Methods-Theory & Practice. 4. painos. Malta: Gutenberg Press Ltd.

Knuuttila, A. 2005. Keuhkosairaudet. 3. uudistettu painos. Hämeenlinna: Kustannus Oy Duodecim.

Koivuniemi, A. 1994. Kliininen sytologia-Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kandidaattikustannus OY.

Maxwell, P., Patterson, A. H., Jamison, J., Miller, K. & Anderson, N. 1999. Use of alcohol fixed cytopins protected by 10% polyethyleneglycol in immunocytology external quality assurance. Journal of Clinical Pathology 52: 141- 144.  
 Nordman, H. & Keskinen, H. 2005. Keuhkosairaudet. 3. uudistettu painos. Hämeenlinna: Kustannus Oy Duodecim.

Nordman, H. Oksa, P. Karjalainen, A. & Koskinen, H. 2006. Asbestisairauksien diagnostiikka ja seuranta. Työterveyslaitos, Helsinki. Tampereen Yliopistopaino Oy.

Palange, P. & Simonds, A. 2010. ERS handbook- Respiratory Medicine. 1. painos. UK: Latimer Trend & Co. Ltd.

PHSOTEY. 2010. Suodatinvalmiste. Patologian työohje. Hyväksytty 22.9.2012.

PHSOTEY. 2012. Sytosentrifugivalmiste. Patologian työohje. Hyväksytty 19.7.2011.  
Rantala, I. & Lounatmaa, K. 1998. Biologinen Valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino.

Roggli, V. L. 2004. Pathology of Asbestos-Associated Diseases. 2. painos. USA: Springer Science + Business Media.

Sakura.1996. Cyto- Tek Centrifuge Operating Manual. USA. Sakura Finetek USA Inc. Torrance.

Skinner, H. Catherine, W. 1988. Asbestos and other fibrous materials : mineralogy, crystal chemistry, and health effects. USA, New York : Oxford University Press.

Stokes, B. O. & Logan, W. 2004. Principles of Cytosentrifugation. Laboratory Medicine 35. American Society for Clinical Pathology.

Syöpäjärjestöt. Luettu 29.7.2012.  
<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/keuhkosyopa/>

Takahashi, M. 1981. Color Atlas of Cancer Cytology. 2. painos. Japan. Igaku-Shoin Ltd. Tokyo.

Taskinen, E., Salmenkivi, K. & Anttila, S. 2005. Keuhkosairaudet. 3. uudistettu painos. Hämeenlinna: Kustannus Oy Duodecim.

Terveysportti. 2012. Lääkkeet ja Hinnat. Päivitetty 1.6.2012.  
[http://www.terveysportti.fi/terveysportti/laakkeet.koti?p\\_tyyppi=&p\\_hakuehto=&p\\_valivalil=&p\\_vvalmist\\_id=&p\\_atc\\_koodi=](http://www.terveysportti.fi/terveysportti/laakkeet.koti?p_tyyppi=&p_hakuehto=&p_valivalil=&p_vvalmist_id=&p_atc_koodi=)

Terveysportti. 2012. Lääkkeet ja Hinnat. Päivitetty 1.6.2012.  
[http://www.terveysportti.fi/terveysportti/laakkeet.koti?p\\_tyyppi=&p\\_hakuehto=&p\\_valivalil=&p\\_valmist\\_id=&p\\_atc\\_koodi=](http://www.terveysportti.fi/terveysportti/laakkeet.koti?p_tyyppi=&p_hakuehto=&p_valivalil=&p_valmist_id=&p_atc_koodi=)

Travis, W. Colby, T. & Koss, M. 2002. Atlas of nontumor pathology-Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract. 1. painos. American Registry of Pathology.

Tukiainen, P. & Taskinen, E. 1988. Bronkoalveolaarinen huuhtelu-Ikkuna keuhkoihin. Duodecimlehti 104: 378 – 385.

Työterveyslaitos. Asbestoosi. Päivitetty 12.11.2010.  
[http://www.ttl.fi/fi/terveys\\_ja\\_tyokiky/ammattitaudit/esimerkkeja\\_ammattitaukeista/asbestoo/Sivut/default.aspx](http://www.ttl.fi/fi/terveys_ja_tyokiky/ammattitaudit/esimerkkeja_ammattitaukeista/asbestoo/Sivut/default.aspx)

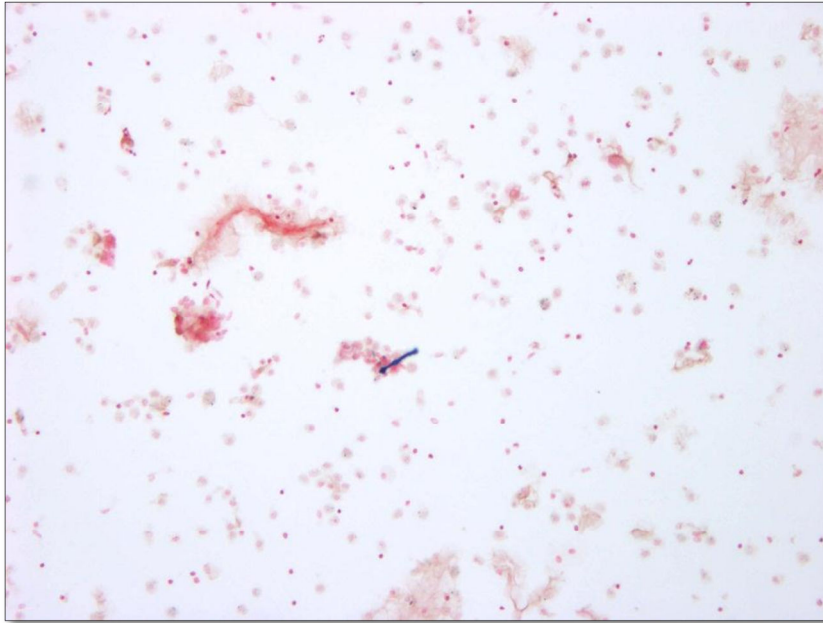
Valtioneuvoston päätös asbestin ja asbestipitoisen tuotteen valmistuksen, maahantuonnin, myymisen ja käyttöönottamisen kieltämisestä annetun valtioneuvoston päätöksen muuttamisesta. 9.12.1993. Luettu 15.8.2012.  
<http://finlex.fi/fi/laki/alkup/1993/19931133>

Woods, A. & Ellis, R. 1994. Laboratory Histopathology-A Complete Reference. 1. painos. UK: Churchill Livingstone.

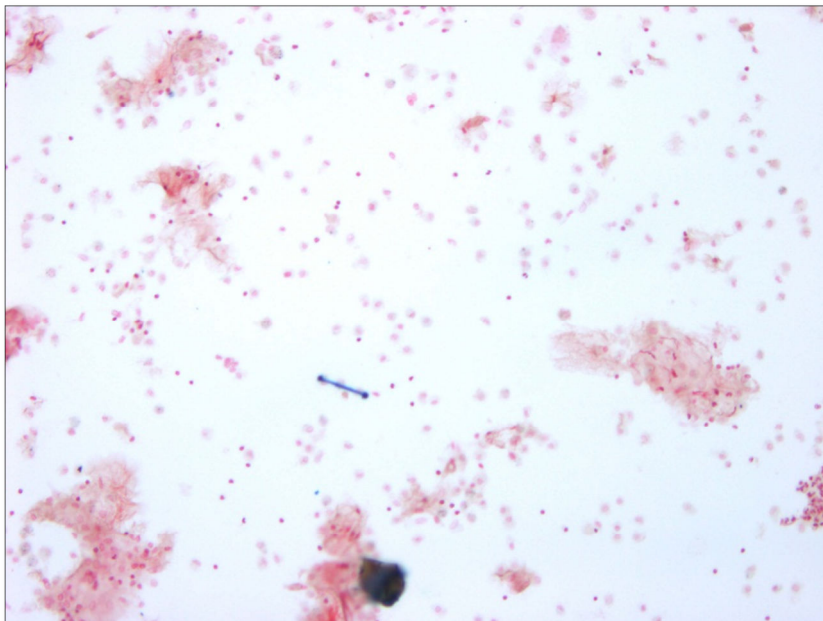
**LIITTEET**

Liite 1. Rautavärjättyjä asbestibodyjä, 100 x suurennoksella

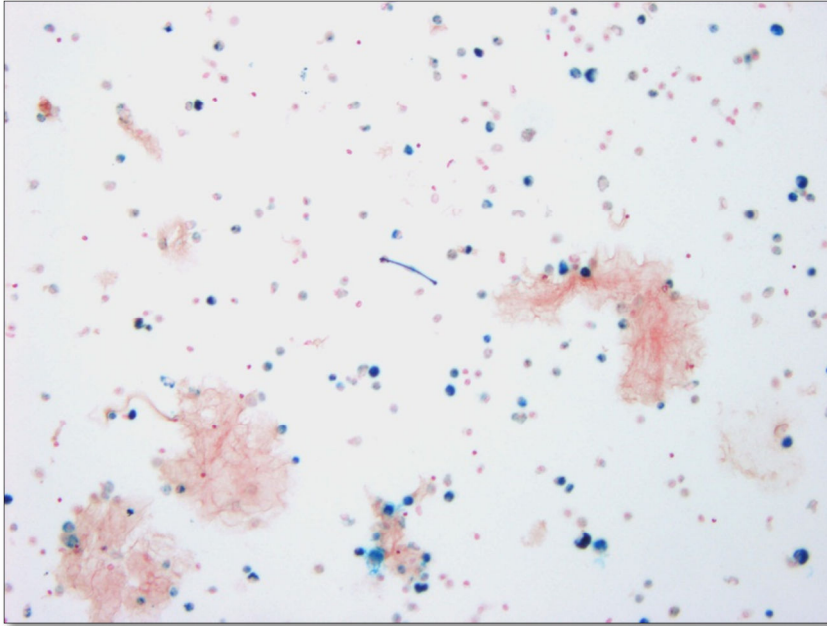
1 (2)



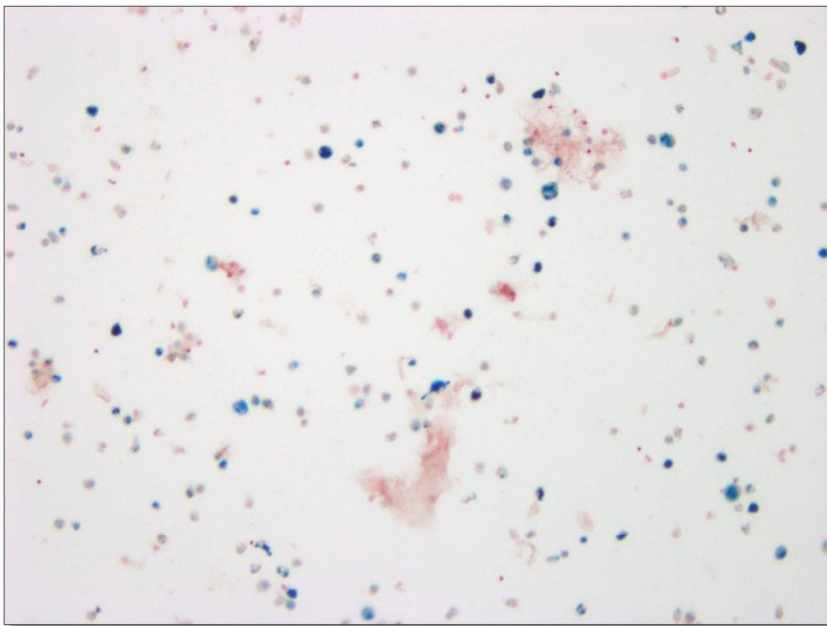
(Kannisto 2012)



(Keituri 2012)



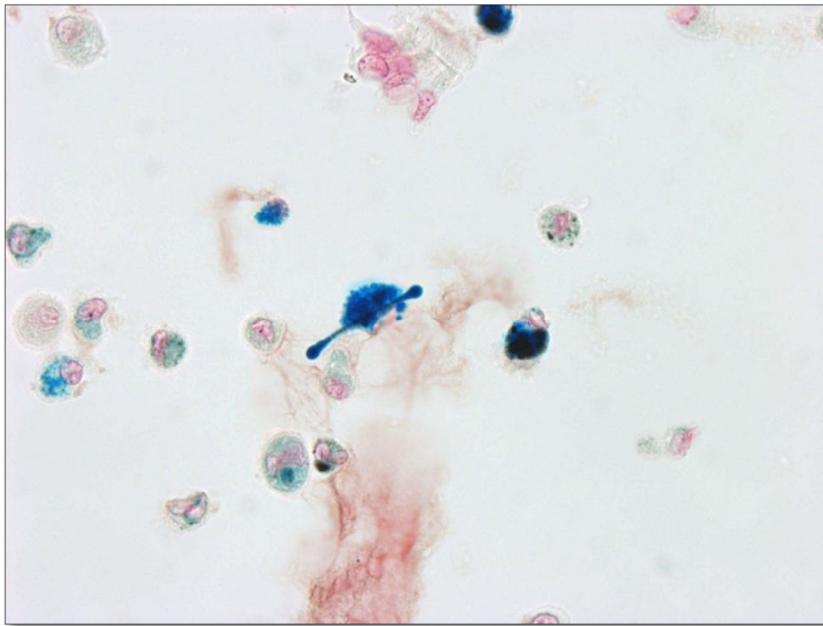
(Kannisto 2012)



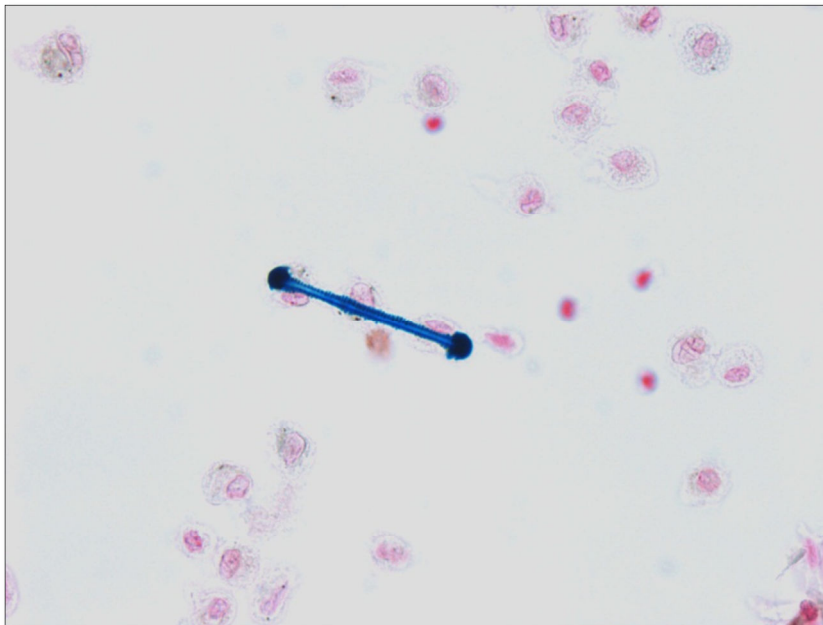
(Keituri 2012)

Liite 2. Rautavärjättyjä asbestibodyjä, 400 x suurennoksella

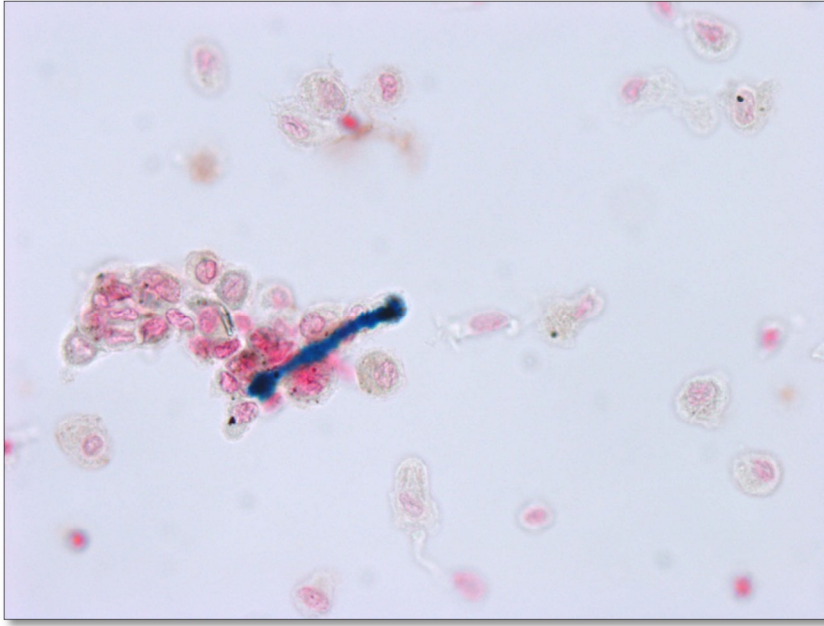
1 (3)



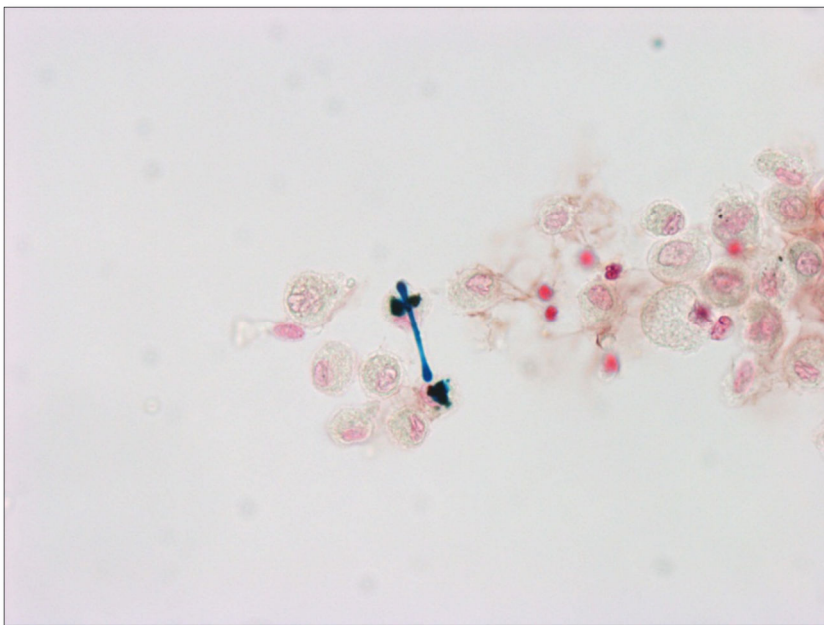
(Kannisto 2012)



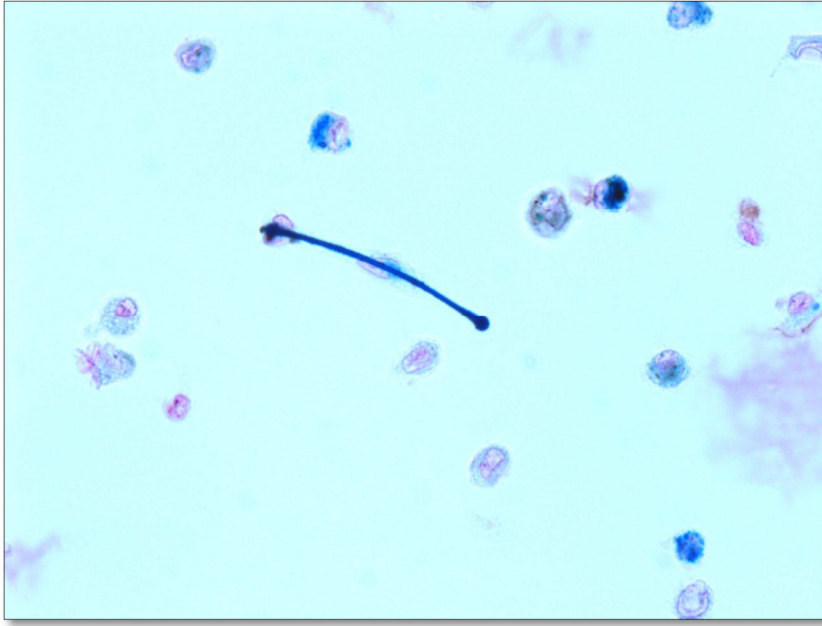
(Keituri 2012)



(Keituri 2012)



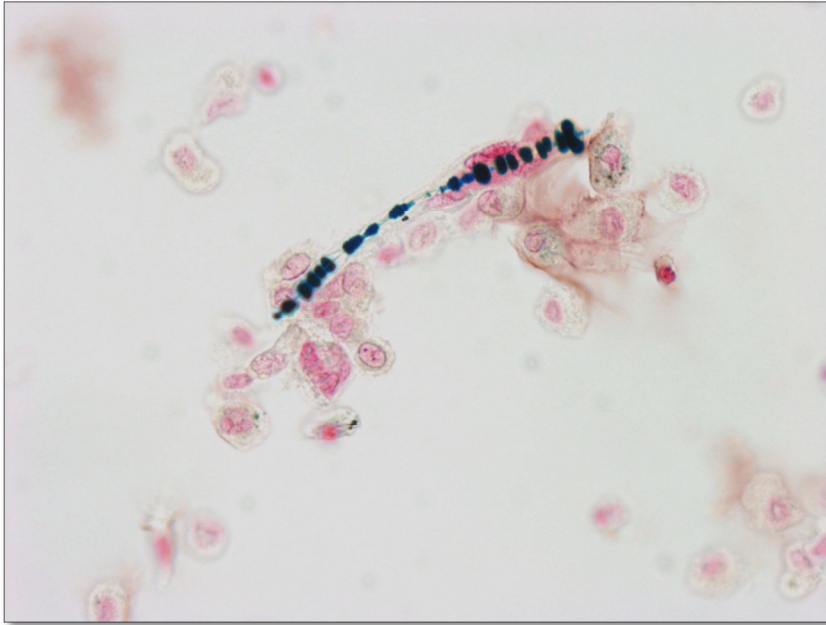
(Keituri 2012)



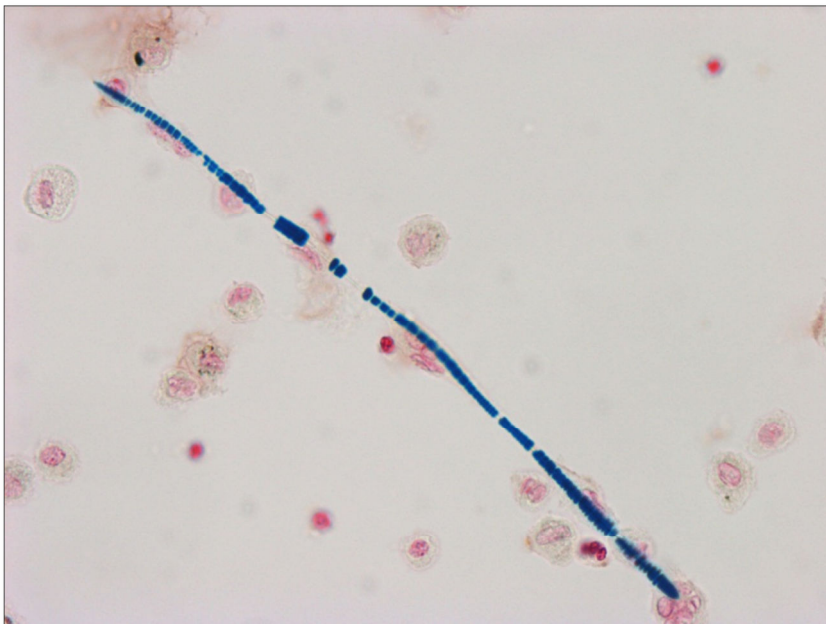
(Kannisto 2012)

Liite 3. Rautavärjättyjä asbestibodyjä, 1000 x suurennoksella

1 (1)

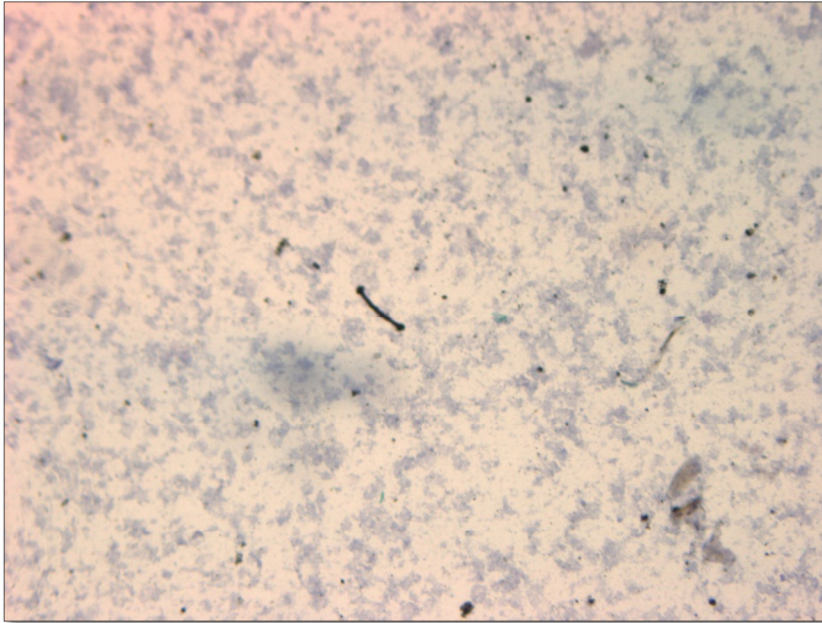


(Keituri 2012)

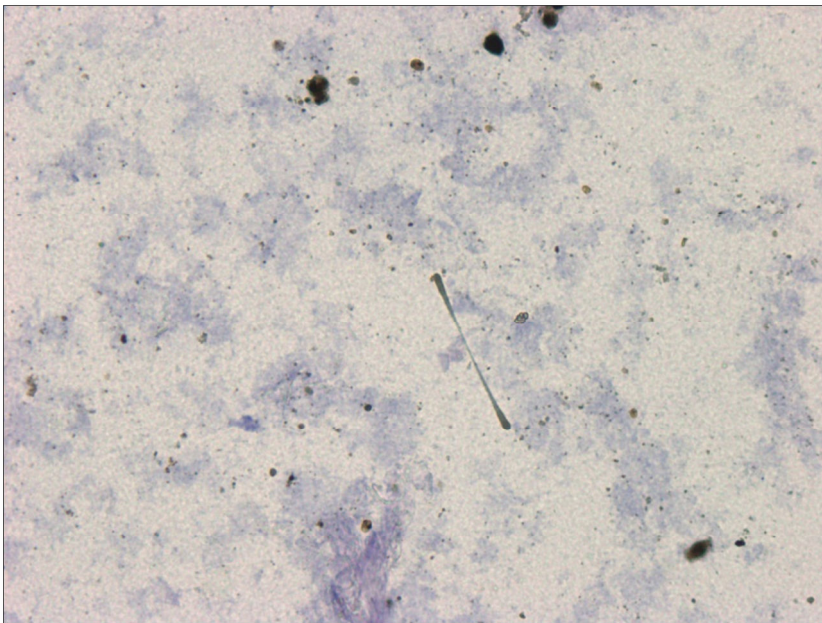


(Keituri 2012)

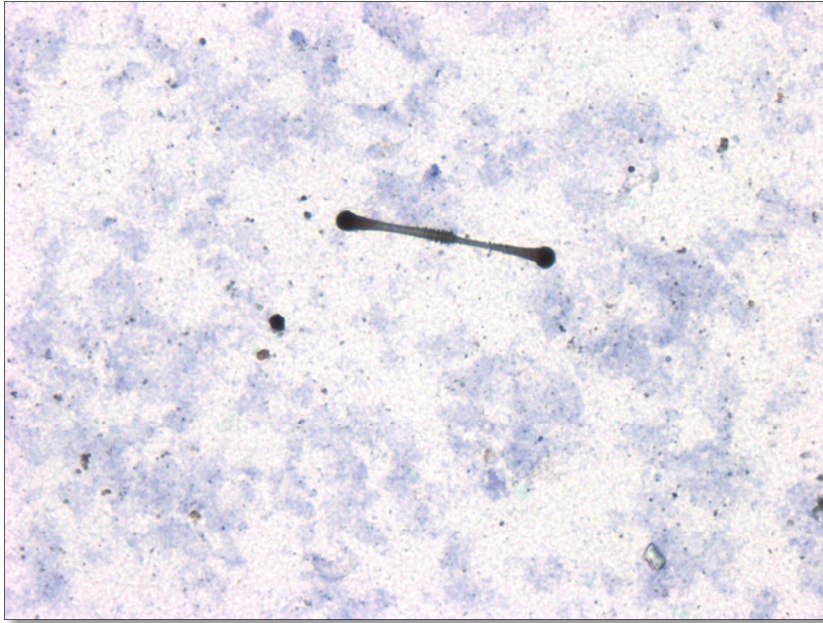
Liite 4. Papanicolaou-värjättyjä asbestibodyjä 100 x- ja 400 x suurennoksella 1 (2)



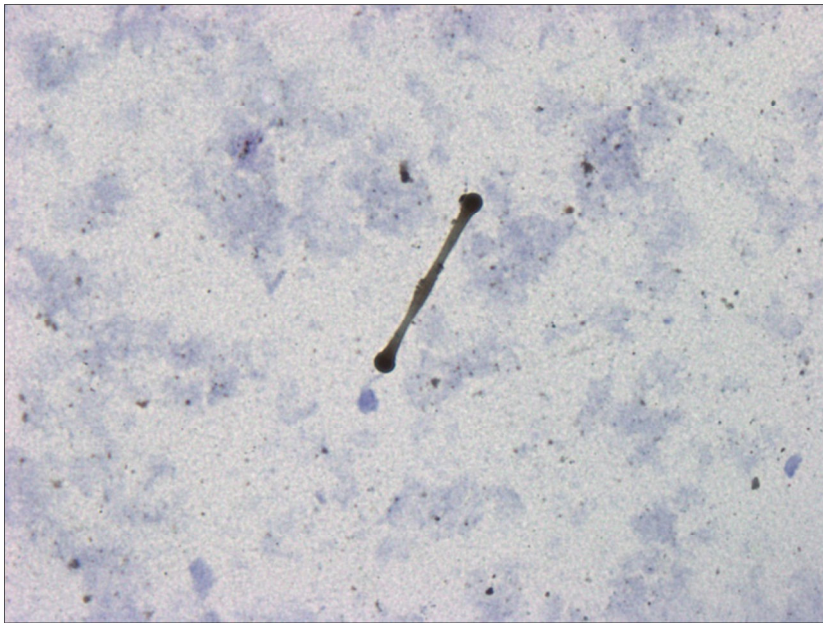
(Keituri 2012)



(Keituri 2012)



(Kannisto 2012)



(Kannisto 2012)