



TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

PT-MODULI IMMUNOHISTOKEMI- ALLISTEN NÄYTTEIDEN ESIKÄ- SITTELYSSÄ

Juha Manninen

Opinnäytetyö
Syyskuu 2014
Bioanalytiikan
koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

JUHA MANNINEN:

PT-Moduli immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyssä

Opinnäytetyö 40 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Syyskuu 2014

Moderni patologia hyödyntää immunohistokemiaa kasvainten tunnistamisessa ja luokittelussa. Solutasolla tapahtuvissa reaktioissa pystytään osoittamaan yksittäisiä antigeeneja, joiden esiintyminen voi vaikuttaa hoidon suunnitteluun. Immunohistokemialliset värjäykset perustuvat vasta-aineiden kykyyn sitoutua spesifisesti omaan antigeeniinsa. Muodostuneet vasta-aine-antigeeni-kompleksit pystytään osoittamaan erilaisilla leimausmenetelmillä ja väriaineilla, eli kromogeeneilla. Tässä työssä käytetyn immunohistokemiallisen värjäyksen detektio perustuu piparjuuren peroksidaasientsyymin ja 3,3'-diaminobentsidiinin reaktiossa syntyvään ruskeaan väriin.

PT-Moduli on immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyyn tarkoitettu laite, jolla pystytään palauttamaan formaliinifikaation aikana kudokappaleiden ja solujen pinnalla tapahtuneita muutoksia. Muutosten palauttaminen (antigen retrieval) on immunohistokemiallisen värjäyksen onnistumisen kannalta tärkeää, koska formaliinifikaation aikana kudorakenteisiin syntyneet metyleenisillat heikentävät kudosten antigeenisyyttä merkittävästi. Korkean lämpötilan esikäsittelyn aikana kudisleikkeet kuumennetaan sopivassa puskuriliuoksessa lähelle kiehumispistettä.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on kokeilla voidaanko PT-Modulia käyttää immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyssä mikroaaltouunin rinnalla. Keski-Suomen keskussairaalan patologian yksikössä immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyt on optimoitu laboratorion käyttöön soveltuvalla mikroaaltouunilla. Mikroaaltouunissa voidaan tehdä vain yksi esikäsittely kerrallaan, kun PT-Moduli puolestaan tarjoaa mahdollisuuden kahteen samanaikaiseen esikäsittelyyn. Verrattaessa PT-Modulia mikroaaltouunitekniikkaan skotlantilainen tutkimusryhmä on osoittanut PT-Modulin käytön edullisuuden esikäsittelyn nopeutumisen, vähäisemmät vahingot kudisleikkeille esikäsittelyn aikana ja mahdollisuuden käyttää suurempia vasta-ainelaimennoksia.

Työn tuloksena PT-Modulin havaittiin soveltuvan immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyyn vasta-ainekohtaisten optimointien jälkeen. Osa kokeilluista 61 vasta-aineesta antoi hyviä värjäystuloksia käytetyissä esikäsittelyolosuhteissa, mutta suurin osa vaatii optimointia esikäsittelyajan ja vasta-ainelaimennoksen osalta.

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree programme in biomedical Laboratory service

JUHA MANNINEN:

Use of PT-Module on Immunohistochemical Antigen Retrieval

Bachelor's thesis 40 pages, appendices 2 pages
September 2014

Modern pathology utilizes immunohistochemistry in the identification and classification of tumours. The immunohistochemical demonstration of cellular antigens may influence on treatment decisions. Immunohistochemical staining is based on the ability of antibodies to react with their respective specific antigens. Antibody-antigen-complexes can be detected by various labelling methods and staining substances, i.e. chromogens. The detection method used in this bachelor's thesis is based on the reaction between the horseradish peroxidase-enzyme and 3,3'-diaminobenzidine forming a brown pigment.

A PT-Module is a laboratory device designed for the pre-treatment of immunohistochemical samples. The device can retrieve the changes on the tissues and cell surfaces caused by formalin fixation. This process is called antigen retrieval. Successful antigen retrieval has a significant impact on staining results: methylene bridges formed during formalin fixation decrease the antigenic properties of a tissue considerably. Tissue sections are heated near the boiling point in an aqueous buffer solution when using high temperature antigen retrieval techniques.

The objective of this bachelor's thesis was to test the PT-Module's suitability for antigen retrieval in comparison with the microwave oven – based techniques. Immunohistochemical staining methods have been optimized for a laboratory grade microwave oven in the Pathology Department of Central Finland Health Care District. Microwave oven is suitable for only one pre-treatment at a time, whereas a PT-Module provides an option to carry out two pre-treatments simultaneously. A Scottish research group compared the microwave oven methods with the PT-Module and discovered that the PT-Module had certain advantages. Their study showed that the use of a PT-Module shortened the pre-treatment time, decreased the mechanical damage of tissue sections and allowed more dilution of the antibodies.

The present bachelor's thesis showed that a PT-Module suits well for antigen retrieval after further optimization. Some of the 61 antibodies used in this study showed good staining results, but most of the antibodies required additional modifications of the pre-treatment time and dilution of the antibody.

Key words: PT-Module, immunohistochemistry, antibodies

SISÄLLYS

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | JOHDANTO..... | 7 |
| 2 | HISTOLOGISEN NÄYTTEEN KÄSITTELY | 9 |
| 2.1 | Fiksaatio..... | 9 |
| 2.1.1 | Fiksaatioon vaikuttavat tekijät | 10 |
| 2.1.2 | Formaliini fiksaatiivina..... | 11 |
| 2.2 | Kudosprosessointi | 12 |
| 2.3 | Valaminen parafiiniin | 13 |
| 2.4 | Mikrotomia ja leikkeiden kiinnitys lasille | 13 |
| 2.5 | Leikkeiden värjäämisestä..... | 14 |
| 2.5.1 | Nouseva ja laskeva alkoholisarja | 15 |
| 2.5.2 | Lasien päällystäminen | 15 |
| 3 | IMMUNOHISTOKEMIA | 16 |
| 3.1 | Immunohistokemian periaatteista | 16 |
| 3.2 | Immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittely | 17 |
| 3.2.1 | Esikäsittelyn tarkoitus | 18 |
| 3.2.2 | Puskurit | 18 |
| 3.3 | Vasta-aineet | 18 |
| 3.4 | Työssä käytettävä immunohistokemiallinen värjäys (Power Vision+™) | 19 |
| 3.4.1 | Primaarivasta-aineet | 19 |
| 3.4.2 | DAB | 20 |
| 3.4.3 | Mayerin hematoksyliini | 20 |
| 3.5 | Värjäysten mikroskopointi..... | 21 |
| 4 | PT-MODULI | 22 |
| 4.1 | PT-Modulin käyttö..... | 22 |
| 4.2 | PT-Modulin käytön edut | 23 |
| 5 | TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE..... | 24 |
| 6 | MATERIAALIT JA MENETELMÄT..... | 25 |
| 6.1 | Näyttemateriaalin valinta | 25 |
| 6.2 | Näyteblokkien leikkaaminen | 25 |
| 6.3 | Näytteiden esikäsittely | 25 |
| 6.3.1 | Puskurit | 26 |
| 6.3.2 | Esikäsittelyn olosuhteiden optimointi | 26 |
| 6.4 | Näytteiden immunohistokemiallinen värjäys | 26 |
| 6.5 | Värjäystulosten arviointi | 27 |

| | | |
|-----|---|----|
| 7 | TUTKIMUSTULOSTEN ARVIOINTI | 28 |
| 7.1 | Esikäsittelyjen suorittaminen | 28 |
| 7.2 | Optimointivaiheen värjäysten tarkastelu | 29 |
| 7.3 | Muiden käytössä olevien vasta-aineiden värjääminen..... | 32 |
| 7.4 | Havaintoja värjäysten laadusta | 34 |
| 8 | JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA | 36 |
| | LÄHTEET | 37 |
| | LIITTEET | 39 |
| | Liite 1. PT-Modulin käyttöohje | 39 |

1 JOHDANTO

Immunohistokemia on tärkeä osa modernia patologiaa (Moodi 4-5, 2000). Histologinen tutkimus tuottaa tietoa kudoksen ja solujen rakenteista, kun puolestaan immunohistokemiallisilla menetelmillä pystytään tarkastelemaan yksittäisten molekyylien, kuten proteiinien esiintyvyyttä kudokskappaleessa. Immunohistokemia on apuna kasvaimen tyypityksessä ja hoitovasteen arvioimisessa. Tieteenalana immunohistokemia on erittäin mielenkiintoista, koska reaktiot tapahtuvat niin pienessä mittakaavassa tuottaen kuitenkin merkittäviä tuloksia.

Työn aiheen sain Keski-Suomen keskussairaalan patologian osastolta sairaalasolubiologi Marjukka Frimanilta keväällä 2008. Laboratoriossa on esikäsittelyyn tarkoitettu Pre-Treatment Moduli (myöhemmin tekstissä PT-Moduli) -laite, jota voidaan käyttää immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyssä. Sairaa lasolubiologi Friman on kokeillut laitteen toimivuutta, mutta varsinaista käyttöönottoa tai metodin kehitystä ei ole ollut aikaa tehdä. Näin ollen työni on siis patologian osaston kannalta tarpeellinen.

Tällä hetkellä immunohistokemiallisten värjäysten esikäsittely suoritetaan mikroaaltouunitekniikalla. Työn tarkoituksena on tuoda PT-Moduli mikroaaltouunitekniikan rinnalle, koska PT-Modulin käyttäminen säästää aikaa ja mahdollisesti myös reagensseja. PT-Modulin etuna on myös se, että lämmitysprosessi voidaan tallentaa tietokoneelle. Mikroaaltouuniastiasta värjättävät lasit täytyy asetella värjäysautomaatin kamppoihin käsin, kun puolestaan PT-Moduliin lasit asetetaan valmiiksi värjäysautomaatin kamppoihin. Tämä tarkoittaa yhden työvaiheen jäämistä pois. Työn tavoitteena on immunohistokemiallisiin menetelmiin syventyminen, immunohistokemiallisten määritysten nopeuden ja laadun parantaminen, sekä laboratoriohoitajien työn helpottaminen.

Työn käytännönosuus koostuu PT-Modulin käytön opettelemisesta ja sen avulla värjättyjen näytteiden vertaamisesta mikroaaltoesikäsittelytekniikkaan. Jotta PT-Moduli voitaisiin ottaa käyttöön mikroaaltouunitekniikan rinnalle, tulisi värjäysten laadun pysyä vähintään samalla tasolla. Mittareina vertailussa käytetään aikaa, reagenssimääriä, sekä värjäysten laatua. Värjäysten laadunarvioinnin suorittavat sairaalasolubiologit Reino Pitkänen ja Marjukka Friman.

Työn teoriaosuudessa käsittelen immunohistokemian kirjallisuuden perusteella, sekä käytännön työn suorittamista Keski-Suomen keskussairaalassa. Teoriaosuudessa käsitelen muun muassa vasta-aineita, detektiota ja värjäyksiä (Dabbs 2006, 1–37; Rantala & Laaksonen 2000). Lisäksi otan huomioon laadulliset näkökulmat (Rantala 2002, Franssila 1998, Helin 1998).

Mikroaaltouunitekniikan käyttämisestä kudosprosessoinnissa on julkaistu muun muassa Stadiassa tehty opinnäytetyö (Pitkähalmes ym. 2007), mutta PT-Modulin käytöstä ei suomalaista tutkimusta ole löydettävissä. Skotlantilainen tutkimusryhmä on käyttänyt PT-Modulia ja huomannut sen merkittävät edut mikroaaltouunitekniikkaan verrattuna. (Gray ym. 2006, 5).

Työni on ajankohtainen ja tarpeellinen, koska Keski-Suomen keskussairaalan patologian osaston näytemäärät kasvavat vuosi vuodelta potilasmäärän ja entistä tarkempien tutkimusten lisääntyessä. Näin ollen työtä nopeuttavat ja helpottavat toimenpiteet ovat ajankohtaisia ja laboratoriohoitajan näkökulmasta varsin tervetulleita.

2 HISTOLOGISEN NÄYTTEEN KÄSITTELY

Histologiset näytteet voivat olla hyvin monenlaisia, kuten esimerkiksi poistettuja luomia tai muita pieniä koepaloja (biopsioita), leikkauspreparaatteja tai luuydinnäytteitä. Näytteiden laaja kirjo vaatii monenlaisia eri tekniikoita näytteiden käsittelyyn, kuten esimerkiksi luunäytteiden dekalsifinointia tai rasvaisen kappaleen pidennettyä fiksaatioaikaa.

Näytteen kulku patologian laboratoriossa alkaa fiksaatiosta, jatkuu kuduskuljetuksen kautta valamiseen ja edelleen leikkaamiseen mikrotomilla. Kudosten ominaisuuksien esilletuomiseksi leikkeet värjätään erilaisilla värjäyksillä, joilla kudoksista saadaan näkyviin haluttuja rakenteita ja mahdollisia muutoksia. Värjäämisen jälkeen lasit päällystetään peitinlaseilla, minkä jälkeen ne ovat valmiita mikroskopoitaviksi.

Tässä työssä käytettyjen kontrollimateriaalien fiksoinnissa on käytetty 10 % puskuroitua formaliinia, joten käsittelen fiksatiiveja lähinnä formaliinin kannalta.

2.1 Fiksaatio

Fiksaation, eli kiinnittämisen tarkoituksena on pysäyttää kudosten solukuolema eli autolyysi. Fiksaatio myös säilyttää solujen muodon ja rakenteen elävän solun kaltaisena. Toisaalta fiksaatio inaktivoi kudoksessa olevat, mahdollisesti tartuntavaaralliset mikroorganismit. Lisäksi fiksaatio kovettaa kudosta, jolloin kudoksen leikkaaminen mikrotomilla tulee mahdolliseksi. (Borley & Warren 2007, 16.)

Fiksatiivit jaetaan kahteen ryhmään vaikutusmekanisminsa perusteella: koaguloivat ja ristisidoksia muodostavat fiksatiivit. Koaguloivia fiksatiiveja on muun muassa etanoli, ristisidoksia muodostavia fiksatiiveja edustaa tavallisimmin käytetty formaldehydi.

Molemmat fiksatiivilajit aiheuttavat muutoksia epitoopeissa, jotka ovat värjäyksessä käytettävien vasta-aineiden kiinnittymiskohtia kudisleikkeessä. Edellä mainituista esimerkeistä etanoli aiheuttaa vähemmän muutoksia kuin formaldehydi. On mahdollista käyttää myös niin sanottua kaksoisfiksaatiota, jolloin kuduskappale fiksoidaan sekä etanolissa, että formaldehydissä. Esimerkkinä kaksoisfiksaatiosta mainittakoon sytologiset solublokkit (Dabbs 2006, 17–18.)

Kirjallisuudessa mainitaan myös muita fiksatiivilajeja, kuten hapettavat fiksatiivit (kaliumpermanganaatti, kaliumdikromaatti), pikriinihappoon perustuva Bouinin liuos ja elohopeaan pohjautuvat liuokset (B-5 ja Zenker's). Joidenkin edellä mainittujen fiksatiivien vaikutusmekanismia ei edes tunneta tarkasti, ja niiden käyttö on vähäisempää verrattuna etanoliin ja formaliiniin. Etanolia käytetään sytologisten, kuten virtsa ja yskösnäytteiden fiksatiivina (Aho 1998, 8).

Immunohistokemian kannalta fiksaatiolla on tärkeä merkitys. Fiksaatiossa solujen pinnalla ja soluissa olevat epitoopit, eli vasta-aineiden sitoutumiskohdat, voivat peittyä, jolloin immunohistokemialliset värjäystulokset heikkenevät (Kyclová ym 2004, 63). Dabbsin (2006, 18) mukaan tutkijat Prento ja Lyon tutkivat kuuden formaliinille vaihtoehdoisen fiksatiivin ominaisuuksia vuonna 1997. Heidän lopputuloksensa kuitenkin oli, että formaliinifiksatio yhdistettynä immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyyn tuottaa patologioiden mielestä parhaiten tulkittavat histologiset tulokset.

2.1.1 Fiksaatioon vaikuttavat tekijät

Fiksaatioon vaikuttavat useat tekijät, kuten fiksaation aloittamisen nopeus, fiksatiivin riittävä määrä, fiksatiivin pH, fiksaatioaika, fiksatiivin konsentraatio, lämpötila ja kudokappaleen koko (Kyclová ym 2004, 63–71). Solukuoleman (autolyysin) välittömän alkamisen takia näytteenottajan tulee huolehtia fiksaation nopeasta aloituksesta ja fiksatiivin riittävästä määrästä, osittain myös lämpötilasta kuljetuksen aikana. Muihin tekijöihin vaikuttaa laboratorion oma toiminta.

Fiksatiivin konsentraatio ja määrä, sekä fiksaatioaika vaikuttavat merkittävästi fiksaation onnistumiseen. Mikäli fiksaatio on epätäydellinen, kudoksen apoptoosia ei saada kokonaan pysäytettyä. Toisaalta liian pitkä fiksaatioaika, kuten esimerkiksi viikonlopun yli, voi johtaa epitooppien peittymiseen formaliinin verkkomaisen rakenteen alle. Yli-fiksoituminen johtaa immunologisten värjäystulosten heikkenemiseen. (Kyclová ym 2004, 64–67.)

Fiksatiivin pH säädetään yleensä lähelle elimistön happamuustilaa, eli välille 6-8, koska pH:n noustessa reaktionopeus nousee ja kudostuho kiihtyy (Bancroft & Gamble 2002,

69). Toisaalta pH:n vaikutukset ovat kyseenalaisia, koska Kyclován tutkimusryhmän (2004, 67) mukaan formaliiniliuoksen pH:lla ei ole merkittävää vaikutusta immunohistokemiallisten värjäysten onnistumiseen.

Kudoscappaleen koon kasvaessa fiksaatioaika kasvaa. Suuren kappaleen fiksoituessa pinta voi olla jo täysin fiksoitunut, kun kudoscappaleen ydin on vielä fiksoitumatta (Kyclová ym 2004, 70–71). Tämän vuoksi suuremmat leikkauspreparaatit pienitään ja kappaleiden väliin laitetaan huokoista materiaalia, kuten paperia, jotta fiksaatio tapahtuisi tasaisemmin. Formaliini kulkeutuu kudoksessa noin 1 millimetrin tunnissa. (Friman 2008.)

2.1.2 Formaliini fiksatiivina

Formaliinilla on todettu olevan monia etuja verrattuna muihin fiksatiiveihin. Formaliini on taloudellisin vaihtoehto ja sillä on pitkä käyttöhistoria patologian alalla. Myös mikro-organismien tuhoaminen on merkittävä formaliinin etu. Useat proteiinit pysyvät kudoscappaleiden sisällä formaliinia käytettäessä. Veden tai alkoholien ollessa fiksatiivina proteiinit diffundoituvat, eli liukenevat kudoksista herkemmin. Toisaalta alkoholien on todettu säilyttävän kudosten immunohistokemialliset ominaisuudet formaliinia paremmin. Formaliinin käyttö perustuu pitkään perinteeseen sekä siihen, että se soveltuu niin histologian kuin immunohistokemian menetelmiin. (Dabbs 2006, 17–18).

Tavallisimmin histologiassa käytettävä formaliiniliuos on neutraaliksi puskuroitua, vahvuudeltaan 10 %:sta liuosta. Puskurointi suoritetaan lisäämällä formaliinin ja veden seokseen fosfaatteja, joiden avulla formaliiniliuoksen pH asettuu välille 7.2–7.4. Puskuroinnin tarkoituksena on välttää verekkäisiin kudoksiin sakkautuvaa formaliinipigmenttiä, jota esiintyy käytettäessä hapanta, puskuroimatonta formaliinia. (Aho 1998, 7).

Formaliinin fiksaatio-ominaisuudet perustuvat sen kemialliseen luonteeseen. Vesiliuoksessa formaliini on metyleeniglykolin ja sen polymeerien, polyoksimetyleenien muodossa. Kudoscappaleen joutuessa formaliiniin, metyleeniglykolimolekyylit tunkeutuvat kudokseen ja alkavat muodostaa sidoksia aminohappojen kanssa. Kudoksessa alkaa

muodostua ristisidoksia proteiinien, sekä proteiinien ja nukleiinihappojen välille, jolloin tyypillinen verkkomainen rakenne alkaa muodostua. (Kyclová ym 2004, 69).

Formaliinin käytön ongelmia ovat muun muassa sen myrkyllisyys ja karsinogeenisyys (Kyclová ym 2004, 69). Formaldehydin tiedetään myös aiheuttavan hengitystieoireita ja ihottumaa herkistymisen yhteydessä. Vaikka formaliini on ihmiselle myrkyllistä, sitä ei kuitenkaan pidetä ympäristölle vaarallisena sen nopean biologisen hajoamisen vuoksi. (Työterveyslaitos 2009).

2.2 Kudosprosessointi

Fiksaation yhteydessä, kuitenkin ennen kudosprosessointia, pienityt kudokskappaleet siirretään muovisiin kuduskuljetuskasetteihin, joissa kudokskappaleet pysyvät sisällä kuduskuljetuksen ajan. Kasetit ovat pieniä muovisia koteloita, joiden pinnat on rei'itetty. Kuduskuljetuksen aikana liuottimet pääsevät virtaamaan vapaasti kasetin läpi käsiteltävään kudospäätteen. Kasetin pohja seuraa kudokskappaletta aina leikkaamiseen saakka, ja näytteen identifiointi perustuu kasettiin tulostetun näytteenumeron avulla.

Kudosprosessoinnilla tarkoitetaan kudokskappaleen valmistelua leikkaamista varten. Kudosprosessoinnissa kudoksista poistetaan vesi ja korvataan se väliaineella esimerkiksi parafiinilla. Jotta parafiini saataisiin siirtymään kudokseen, tulee kudoksesta poistaa vesi. Dehydraatio suoritetaan viemällä kudokskappale nousevan alkoholisarjan läpi alkaen tavallisesti 50 % etanolista ja päättyen absoluuttiseen etanoliin. Absoluuttisesta etanolista vedetön kudokskappale siirretään ksyleeniin, jossa kirkastus tapahtuu. Kirkastamisella tarkoitetaan kudoksen muuttumista läpikuultavaksi. (The internet pathology laboratory for medicinal education 1994–2008).

Ksyleeni toimii myös prosessin väliliuottimena, koska parafiini ei sekoitu alkoholiin. Ksyleenin jälkeen viimeinen vaihe on kudokskappaleen vieminen sulaan parafiiniin. Parafiini tunkeutuu kudokseen ja tekee siitä leikkauskelpoisen. (The internet pathology laboratory for medicinal education 1994–2008).

2.3 Valaminen parafiiniin

Valaminen aloitetaan nostamalla näyttekasetit pois sulasta parafiinista. Kuduskappaleet valetaan metallisien muottien avulla, jotta parafiiniblokeista saadaan halutun kokoisia ja muotoisia. Metallimuotin pohjalle valutetaan hiukan sulaa parafiinia jonka jälkeen kuduskappale asetetaan siihen oikein päin. Kasetin pohja, jossa näytteen tunnistetiedot ovat, asetetaan muotin päälle ja muotti täytetään parafiinilla siten, että kasetti tarttuu kiinni parafiinimassaan. Tämän jälkeen muottia jäähdytetään, tavallisesti kylmälevyllä, kunnes jähmettynyt parafiiniblokki irtoaa valumuotista. Valmiista blokista otetaan ylimääräinen parafiini pois leikkaamisen helpottamiseksi. (Manninen 2012.)

Valamisessa on tärkeää huomioida kuduskappaleen luonne ja alkuperä. Esimerkiksi luomet valetaan siten, että tulevat leikkeet tuovat esiin luomen ja ihon kaikki kerrokset. Muidenkin kudoksenäytteiden kohdalla tulee harkita valuasentoa, jottei valettua blokkia tarvitse leikata läpi koko näytteen tutkimiseksi. (Manninen 2012.)

2.4 Mikrotomia ja leikkeiden kiinnitys lasille

Mikrotomi on laite, jolla parafiiniin valetut näytteet leikataan. Tavallisimpia ovat liuku- ja rotaatiomikrotomit, myös rotaatiomikrotomiin yhdistetty vesiliuku on yleinen. Liukumikrotomissa näyteblokki pysyy paikallaan ja terä liikkuu, kun rotaatiomikrotomissa puolestaan terä on paikallaan ja näyteblokki liikkuu. Vesiliukumikrotomeissa terästä irronnut leike valuu vesivirran mukana kylmävesiastian helpottaen leikkeen poimimista lasille.

Valmistauduttaessa leikkeiden tekoon blokkeja säilytetään kylmälevyllä, koska se helpottaa leikkaamista. Kun parafiiniblokkia leikataan, tulee siitä ensin höylätä, eli trimmata pinnassa oleva parafiini pois, jotta koko kudospala saadaan näkyviin. Kun kuduskappale on näkyvillä, pyritään blokista leikkaamaan ehyitä, mahdollisimman ohuita leikkeitä. Kun leike irtoaa terällä, se poimitaan siveltemien avulla ja viedään kylmään veteen. Kylmästä vedestä leike poimitaan objektilasin avulla ja suoristetaan lämpöhauteessa. Lopuksi leikkeet kiinnitetään lämpölevyllä, jonka lämpötila vastaa parafiinin sulamispistettä.

Poikkeuksena lämpölevyllä tapahtuvaan leikkeiden kiinnitykseen ovat immunohistokemialliset näytteet, jotka leikataan Superfrost-laseille. Superfrost-lasit kuivatetaan pystyasennossa ja leikkeet kiinnitetään lämpökaapissa $+37^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa yön yli.

Mikrotomia on vaativa osuus histologisessa työssä. Monet tekijät, kuten lämmennyt blokki, kova tai rasvainen kuduskappale, epätäydellinen fiksaatio tai tylsä veitsi hankaloittavat leikkaamista. Harjoittelemalla leikkaaminen on opittavissa, ja esimerkiksi parafiiniblokkiin puhaltaminen tai sen pinnan kostuttaminen vedellä edesauttaa hyvän leikkeen saamista.

2.5 Leikkeiden värjäämisestä

Kuduskappaleen eri osien tutkimista varten kuduskappaleet ja niiden rakenneosat värjätään eri väreillä. Yhdellä värjäyksellä leikkeestä saadaan erottumaan monia eri osia ja rakenteita. (Solunetti 2006) Tavallisia histologisia värjäyksiä ovat muun muassa hematoksyliini-eosiini (myöhemmin tekstissä HE), Giemsa, Alcian Blue -perjodihappo, Berliininsini ja Van Gieson. Kutakin värjäystä käytetään osoittamaan kudoksesta tiettyjä yksityiskohtia.

Hematoksyliini-eosiini-värjäys on eniten käytetty histologinen värjäysmenetelmä patologian laboratoriossa. HE-värjäys perustuu kasvikunnasta saatavan hemateiinin hapetumiseen, joskin nykyisin hemateiini syntetisoidaan. Luonnosta uutettu hemateiini kypsytetään ennen käyttöä, jotta se pystyy värjäämään kudoksia. Lisäksi hematoksyliini vaatii kationin läsnäolon, joka tavallisimmin on alumiini- tai rauta-ioni. Hematoksyliini värjää solujen tumat sinisiksi. (The internet pathology laboratory for medicinal education 1994–2008).

HE-värjäys on regressiivinen värjäys, eli näyte ylivärjätään hematoksyliinilla, jonka jälkeen ylimääräinen väri poistetaan leikkeestä laimealla suolahapolla. Liian hematoksyliinin poiston jälkeen leikkeet värjätään eosiinilla, joka on hapan väri. Eosiini värjää solujen sytoplasmiset rakenteet, sekä sidekudoskomponentin punertaviksi. (The internet pathology laboratory for medicinal education 1994–2008).

2.5.1 Nouseva ja laskeva alkoholisarja

Ennen varsinaisten väriaineiden käyttöä parafiinileikkeistä poistetaan parafiini ksyleenillä. Ksyleeni poistetaan viemällä lasi absoluuttisen alkoholin kautta miedompia alkoholiliuoksia kohti ja lopuksi veteen. Veteen vieminen, eli hydraus, on edellytys värien tarttumiselle leikkeeseen. Kun haluttu värjäys on suoritettu, leike viedään nousevan alkoholisarjan kautta ksyleeniin, jolloin vesi poistuu leikkeestä. (Solunetti 2006).

Alkoholisarjojen läpiviemiseen käytetään tavallisesti värjäysautomaatteja. Koska alkoholi ja ksyleeni ovat haihtuvia yhdisteitä, alkoholisarjat ja värjäysautomaatit ovat usein vetokaapeissa. Värjäyskoneiden käyttö helpottaa värjääjän työtä, koska leikkeet ovat yhdessä alkoholissa vain muutaman minuutin. Useat erikoisvärjäykset, kuten hopeavärjäykset, vaativat poikkeavia olosuhteita esimerkiksi lämpötilan suhteen. Näiden värjäysten vieminen värjäysautomaateille on hankalaa, joten ne suoritetaan edelleen käsivärjäyksinä tai erikoisvärjäysautomaateissa.

2.5.2 Lasien päällystäminen

Lasien päällystäminen voidaan tehdä käsin, erillisellä päällystysautomaatilla tai värjäyskoneeseen liitettyllä päällystysautomaatilla. Päällystyksessä leikkeen päälle laitetaan joko ksyleenin avulla kiinnittyvä filmi tai päällystysaineen avulla kiinnittyvä peitinlasi. Peitinlasipäällystyksessä yleisesti käytettäviä, kaupallisia päällystysaineita ovat Depex ja Pertex. Päällystysautomaattien käyttäminen on työntekijälle turvallisempaa ja miellyttävämpää, sillä ksyleenialtistuksen on todettu aiheuttavan ärsytystä, päänsärkyä ja hengenahdistusta. (Työterveyslaitos 2009.)

3 IMMUNOHISTOKEMIA

Immunohistokemiallisia värjäyksiä tehdään kuduskappaleille, joiden patologist-anatominen diagnoosi vaatii tarkempaa selvitystyötä. Immunohistokemia auttaa kasvainten tunnistamisessa ja luokittelussa, joilla on puolestaan suuri merkitys hoidon suunnittelussa (Rantala & Laasonen 2000, 148). Immunohistokemialliset värjäykset perustuvat herkkiin ja spesifisiin immunologisiin reaktioihin, joilla kudisleikkeistä osoitetaan antigeenejä (Rantala & Laasonen 2000, 148).

3.1 Immunohistokemian periaatteista

Immunohistokemialliset värjäykset perustuvat vasta-aineiden ja niiden tunnistamien antigeenien välisiin vuorovaikutuksiin. Optimaalisessa tapauksessa käytetty vasta-aine sitoutuu spesifisesti vain ja ainoastaan omaan antigeeniinsa. Muodostunut vasta-aine-antigeeni-kompleksi leimataan sopivalla merkkiaineella jotta se voidaan havaita mikroskopoimalla. (Solunetti 2006).

Immunohistokemiallisia värjäysmenetelmiä ovat suora, epäsuora, peroksidaasi-antiperoksidaasi-, avidiini-biotiini-piparjuuriperoksidaasi- ja polymeeri-piparjuuriperoksidaasimenetelmä (Dabbs 2006). Suorassa menetelmässä käytettävään vasta-aineeseen on liitetty leima, joka saadaan näkyviin pelkällä vasta-aine-antigeeni-reaktiolla. Epäsuorassa menetelmässä primaarivasta-aine sitoutuu antigeeniinsa, jonka jälkeen sekundaarinen, leimattu vasta-aine sitoutuu ensimmäisessä vaiheessa muodostuneeseen kompleksiin. Epäsuoran menetelmän etuja ovat parempi herkkyys, parempi värjäysintensiteetti ja esimerkiksi se, että primaari- ja sekundaarivasta-aine voidaan tuottaa eri eläimissä. (Solunetti 2006).

Peroksidaasi-antiperoksidaasimenetelmässä primaarivasta-aineeseen kiinnittyy leimaamaton sekundaarivasta-aine, johon edelleen kiinnittyy peroksidaasi-antiperoksidaasikompleksi. Avidiini-biotiinimenetelmässä primaarivasta-aineeseen kiinnittyy ABC-kompleksi, mikä koostuu biotiniloidusta sekundaarivasta-aineesta ja avidiini-biotiini-piparjuuriperoksidaasi-kompleksista. Polymeeri-piparjuuriperoksidaasimenetelmässä primaarivasta-aineeseen liitetään polymeeri-piparjuuriperoksidaasi, mikä

koostuu sekundaarivasta-aineesta ja pitkään polymeerimolekyylisiin liitetyistä piparjuuri-peroksidaasimolekyyleistä. (Dabbs 2006).

Immunohistokemiallisten värjäysten optimointi on hyvin vaativaa, koska jo näytepalojen kuduskuljetuksessa tapahtuvat virheet voivat vaikuttaa värjäysten lopputulokseen. Kudospalojen pieneminen riittävän pieniksi kappaleiksi ja nopea fiksaatio ovat tärkeitä vaiheita prosessin alkupäässä. Immunohistokemiallisten värjäysprosessien aikana käytettävien esikäsittelypuskureiden pH-arvo ja primaarivasta-aineen ominaisuudet vaikuttavat niin ikään merkittävästi värjäystulokseen. (Moodi 1/2006).

Immunohistokemiallisten värjäysten laadunvalvonnassa käytetään positiivisia ja negatiivisia kontrolleja. Positiivisina kontrolleina käytetään kudismateriaaleja, joiden tiedetään olevan positiivisia tutkittavan antigeenin suhteen. Käytännössä positiivinen kontrollikudos leikataan tutkittavan potilasnäytteen kanssa samalle objektilasille. Näin varmistetaan, että sekä kontrollin että potilasnäytteen värjäyksen olosuhteet ovat identtiset. Värjäyssarjoissa käytetään myös negatiivisia kontrolleja, joiden avulla voidaan arvioida epäspesifisen sitoutumisen aiheuttamaa taustavärjäytymistä. (Friman 2008).

3.2 Immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittely

Kuten kappaleessa 2.4 todettiin, parafiiniblokista leikatut näytelasit kiinnitetään +37 °C:een lämpötilassa yön yli. Tämän jälkeen lasit esikäsitellään kullekin vasta-aineelle optimoidulla tavalla. Osa antigeeneista, esimerkiksi useat hormonit, voidaan osoittaa myös ilman esikäsittelyä (Moodi 4–5 2000).

Esikäsittelymenetelmät jaetaan kahteen ryhmään: entsyymattisiin ja korkeaan lämpötilaan perustuviin menetelmiin. Entsyymattiset menetelmät perustuvat proteaasien kykyyn purkaa formaliinifiksaation muodostamia ristsidoksia. Korkean lämpötilan menetelmissä näytelaseja kuumennetaan puskuriliuoksessa kiehumispisteeseen asti. Joillekin vasta-aineille sovelletaan molempien menetelmien yhdistelmää, jossa lämpökäsittelyn jälkeen näytelasit käsitellään sopivalla entsyymillä. (Moodi 4–5 2000).

3.2.1 Esikäsittelyn tarkoitus

Formaliinifiksaation aikana kudusrakenteisiin syntyy metyleenisiltoja, eli ristisidoksia kudskomponenttien molekyytirakenteiden välille. Muuntunut rakenne heikentää kudosten antigeenisyyttä merkittävästi. Antigeenisyyden palauttamiseksi käytetään paljastusmenetelmiä (antigen retrieval), joiden avulla kudoksen rakenteet pyritään palauttamaan formaliinifiksaatiota edeltäneeseen muotoon. (Moodi 1/2006).

3.2.2 Puskurit

Suurin osa antigeeneista saadaan paljastettua käyttämällä sitraattipuskuria, jonka pH on 6, mutta jotkut vasta-aineet kuitenkin vaativat huomattavasti happamamman puskurin (pH 1–3) tai emäksisen puskurin (pH 9–10) (Moodi 4–5/2000). Keski-Suomen keskussairaalan patologian laboratoriossa käytetään sitraattipuskuria (pH 6) ja tris-EDTA-puskuria (pH 9).

3.3 Vasta-aineet

Vasta-aineet ovat molekyyliä joilla on kyky sitoutua vasta-kappaleeseensa, eli antigeeniin. Vasta-aineita syntyy plasmasoluissa ja ne kuuluvat immunoglobuliinien ryhmään. Polyklonaaliset vasta-aineet tunnistavat useita antigeeneja, kun monoklonaaliset vasta-aineet tunnistavat vain yhden niille spesifin antigeenin. Vasta-aineen ja antigeenin reaktion spesifisyyden määrittelee niiden sitoutumiskohdan kolmiulotteinen rakenne. (Moodi 4–5/2000).

Vasta-aineita tuotetaan soluviljelmissä tai isäntäeläimissä. Koska plasmasolujen elinkaari on lyhyt, soluviljelmissä käytetään plasmasolujen ja myeloomasolujen hybridejä, hybridoomasoluja. Hybridoomasolun rajoittamaton jakautuminen perustuu myeloomasolun ominaisuuksiin ja tämä mahdollistaa vasta-aineiden tuottamisen suuremmassa mittakaavassa. (Solunetti 2006).

3.4 Työssä käytettävä immunohistokemiallinen värjäys (Power Vision+™)

Esikäsitteilyn jälkeen varsinaisen värjäyksen ensimmäinen vaihe on peroksidaasi-blokkaus, eli vetyperoksidikäsitteily. Käsitteilyn tarkoituksena on poistaa endogeenisen peroksidaasin aiheuttama taustavärjäytyminen. Vetyperoksidikäsitteilyä seuraa toinen taustavärjäytymistä vähentävä vaihe, pre-antibody blocking. (Friman 2008)

Taustavärjäytymistä vähentävien vaiheiden jälkeen näytelaseille lisätään tutkittavalle antigeenille spesifinen primaarivasta-aine. Vasta-aine hakeutuu antigeenien läheisyyteen ja kiinnittyy antigeenin epitooppeihin. Primaarivasta-aineen jälkeen näytelaseja huuhdellaan puskuriliuoksella, joka poistaa ylimääräisen, sitoutumattoman primaarivasta-aineen. Huuhtelua seuraa post-block-käsitteily, joka edesauttaa polymeraasin tunkeutumista näytteeseen (Friman 2008).

Primaarivasta-aineen jälkeen näytelaseille lisätään sekundaarivasta-aine, joka Power-Visionin kitissä on piparjuuren peroksidaasi-entsyymeillä kyllästetty polymeeriketju. Värjäyksen viimeisessä vaiheessa näytelaseille lisätään kromogeeni, joka PowerVisionin kitissä on DAB (3,3'-diaminobentsidiini). Piparjuuren peroksidaasi katalysoi kromogeenissä olevan vetyperoksidin hajoamista hapettaen kromogeenin ruskeaksi väriksi. (Friman 2008).

Värjäyksen viimeisenä vaiheena kudosten rakenteet ja tumat tuodaan näkyviin tumavärjäyksellä. Tumavärjäys suoritetaan värjäysautomaatilla 1:10 laimennetulla Mayerin hematoksyliinilla. Tumavärin jälkeen lasit siirtyvät nousevaan alkoholisarjaan ja päällystetään peitinlaseilla.

3.4.1 Primaarivasta-aineet

Keski-Suomen sairaanhoitopiirin patologian osastolla on käytössä noin 90 eri primaarivasta-ainetta. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä käytettävä primaarivasta-aine valitaan tutkittavan kudoksenäytteen mukaan. Esimerkiksi rintasyöpänäytteistä värjätään estrogeeni- (ER) ja progesteronireseptorit (PR), HER2-proteiini, sekä arvioidaan jakautumisnopeus Ki-67-värjäyksellä. Tarvittaessa tehdään myös muita värjäyksiä.

Primaarivasta-aineiden ominaisuudet vaikuttavat merkittävästi immunohistokemiallisen värjäyksen herkkyyteen. Tärkeimmät vasta-aineen ominaisuudet ovat sen spesifisyys ja affiniteetti tutkittavaa antigeenia kohtaan. Myös vasta-aineen laimentamiseen käytettävän puskurin pH-arvo vaikuttaa vasta-aineiden varautuneisuuteen ja immunoreaktiivisuuteen.

Vasta-aineiden laajan kirjon vuoksi ei ole olemassa yleispätevää värjäysprotokollaa, vaan jokaisen vasta-aineen optimaaliset olosuhteet ovat hiukan toisistaan poikkeavia. Olosuhteisiin vaikuttavat muun muassa puskuriliuoksen ionikonsentraatio ja pH, sekä korkean lämpötilan esikäsittelyissä sopiva ajan ja lämpötilan yhdistelmä. Myös vasta-aineen laimennussuhde vaikuttaa värjäystulokseen merkittävästi: liian suuri laimennoskerroin voi johtaa väärään negatiiviseen tulokseen, kun puolestaan liian pieni laimennoskerroin saattaa johtaa runsaaseen taustavärjäytymiseen ja sitä kautta hankaloittaa värjäyksen tulkintaa.

3.4.2 DAB

DAB, eli 3,3'-diaminobentsidiini-tetrahydrokloridi toimii PowerVisionTM-kitissä kromogeeninä, toisin sanoen mahdollistaa värjäystulosten havaitsemisen valomikroskooppilla. Kuten kappaleessa 3.4 todettiin, DAB reagoi piparjuuren peroksidaasi-entsyymin kanssa muodostaen ruskean sakan.

DAB:in epäillään aiheuttava syöpäsairauden vaaraa ja se on ympäristölle haitallista. Ennen DAB:in hävittämistä reagenssi tulee neutraloida käyttämällä hypokloriittia

3.4.3 Mayerin hematoksyliini

Tumavärjäyksessä hematoksyliini sitoutuu peittausaineiden avulla kudosteille ja hapettuessaan muuttuu hemateiiniksi aikaansaaden tummansinisen värin. Mayerin hematoksyliini värjää leikkeissä olevien tumien nukleiinihapot. Tumavärjäyksen tarkoituksena on helpottaa mikroskopointia ja tulosten tulkintaa.

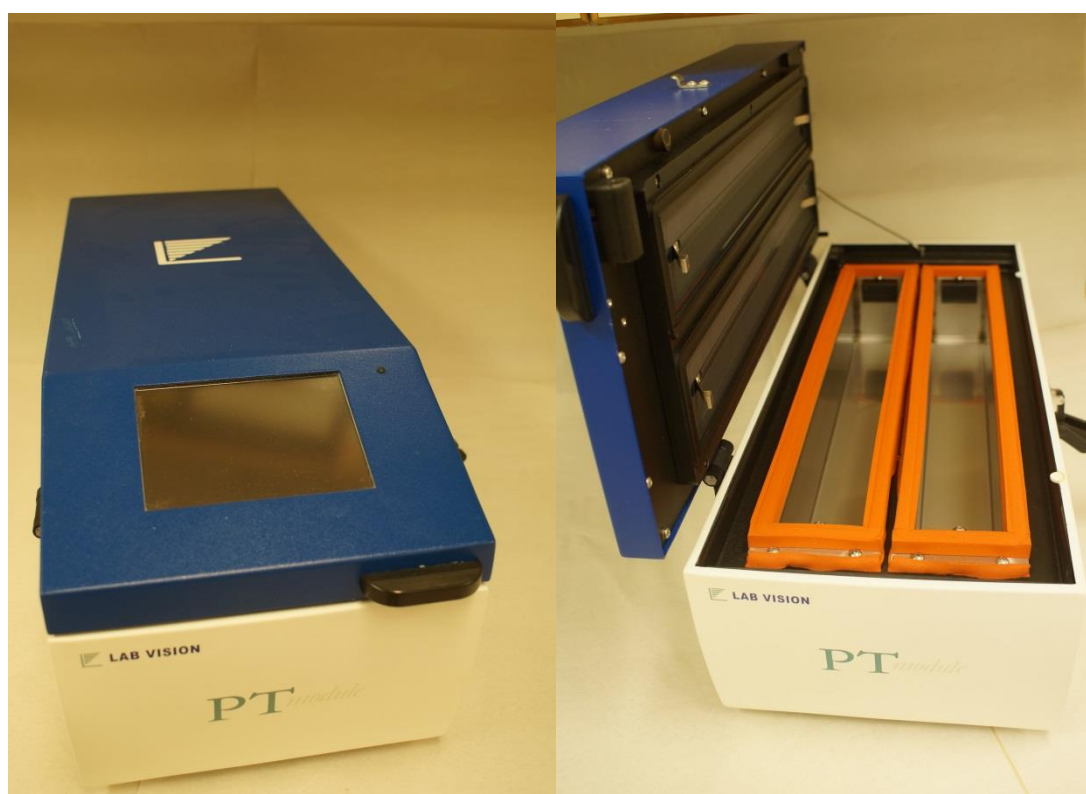
3.5 Värjäysten mikroskopointi

Keski-Suomen keskussairaalan patologian osastolla immunohistokemiallisia värjäystuloksia arvioidaan silmämääräisesti. Negatiivisesti värjäytynyt näyte vastataan luonnollisesti negatiiviseksi tulokseksi. Mikroskopoinnin aikana tarkastellaan myös taustavärjäytymistä.

Positiivisen kontrollimateriaalin käyttäminen on välttämätöntä, jotta negatiiviset värjäystulokset voidaan vastata luotettavasti. Laadunvalvonnasta vastaa osaston sairaalasolubiologi, joka tarkastaa immunohistokemialliset näytelasit ennen kuin ne viedään patologeille vastattavaksi.

4 PT-MODULI

PT-Moduli on Labvisionin valmistama, immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyyn tarkoitettu laite. Laite on hyvin yksinkertainen ja helppokäyttöinen. Laitteessa on kaksi allasta, joiden alla on lämmitysvastukset. Lisäksi laitteeseen kuuluu kevyt jäähdytysjärjestelmä, jonka avulla laite jäähdyttää esikäsittelypuskurin ohjelman päättymisen jälkeen. Laitetta ohjataan yksinkertaisen kosketusnäytön avulla. Laitteen merkittävä etu on se, että altaissa voidaan tehdä kaksi erilaista esikäsittelyä yhtä aikaa.



KUVA 1. PT-Moduli

4.1 PT-Modulin käyttö

Laite asetetaan vaakasuoralle pinnalle ja kytketään verkkovirtaan. Altaisiin kaadetaan halutut esikäsittelypuskurit ja kansi suljetaan. Kosketusnäytöltä syötetään näytelaseille haluttu esikäsittelyaika ja -lämpötila. Kun laite käynnistetään, se aloittaa ns. pre-heat-vaiheen, eli esikuumentaa esikäsittelypuskurit $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$:een lämpötilaan. Saavutettuaan tämän lämpötilan laite odottaa lasien asettamista koneeseen. (Friman 2008).

Esikäsiteltävät lasit asetetaan värjäysautomaatin kampoihin hiospää kamman tyveä koh-
ti. Kammat laseineen asetetaan PT-Moduliin ja kansi suljetaan. Kosketusnäytöltä käyn-
nistetään varsinainen ohjelma. Kun laseja on inkuboitu tavoitelämpötilassa haluttu aika,
kone jäädyttää altaiden sisällön takaisin +65 °C:een lämpötilaan. Ohjelman pysähdyt-
tyä turvasalpa vapautuu ja laitteen kansi voidaan avata. Laitetta avattaessa sen sisältä
vapautuu kuumaa höyryä, joka saattaa aiheuttaa työturvallisuusriskin. (Friman 2008).

Kammat voidaan siirtää PT-Modulista suoraan värjäysautomaattiin. On tärkeää muistaa,
että lasien lämpötila tällä hetkellä on + 65 °C, joten parafiinileikkeet kuivuvat hyvin
nopeasti puskurin haihtuessa leikkeiden päältä. Tämän estämiseksi kannattaa pipetoida
puhdistettua vettä (UHP-vesi) tai värjäyksessä käytettävää puskuria värjäyskoneeseen
asetettujen leikkeiden päälle. (Friman 2008).

4.2 PT-Modulin käytön edut

Gray tutkimusryhmineen havaitsi monia etuja PT-Modulin käytössä verrattuna mikro-
aaltotekniikkaan: esikäsitteily nopeutuu, laite on mikroaaltotekniikkaa hellävaraisempi
leikkeille ja vasta-aineita voidaan laimentaa enemmän. Myös laitteen käyttäjäystävälli-
syys, sekä värjäyskoneen omien kampojen käyttö ovat selviä etuja. (Gray ym. 2006, 5).

5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITE

Työni tarkoituksena on kokeilla PT-Modulia immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyssä Keski-Suomen keskussairaalan patologian osastolla. PT-Modulin käyttö säästää aikaa ja mahdollisesti myös reagensseja, sekä jossain määrin myös keventää laboratoriohoitajan työtaakkaa. Suurista näytemääristä johtuen se ei kuitenkaan ole syrjäyttämässä mikropaattouuniteknikkaa kokonaan, vaan niiden on tarkoitus toimia rinnakkain.

Työni tavoitteena on immunohistokemiallisiin menetelmiin perehtyminen, immunohistokemiallisten värjäysten nopeuden ja laadun nostaminen, sekä laboratoriohoitajien työn helpottaminen.

Keskeinen tutkimustehtävä on siis selvittää soveltuuko PT-Moduli immunohistokemiallisten näytteiden esikäsittelyyn ja saadaanko sillä vähintään yhtä hyviä tuloksia kuin mikropaattouuniteknikalla.

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Näytemateriaalin valinta

Materiaaliksi valittiin Keski-Suomen keskussairaalan patologian laboratorion käyttämiä immunohistokemian positiivisia kontrolleja. Kontrollien käyttö nopeutti työtäni huomattavasti, koska kontrolliblokkien tiedettiin olevan positiivisia tiettyjen antigeenien suhteen. Näin ollen värjäystuloksen odotusarvo oli tiedossa kunkin värjäyksen kohdalla. Toinen merkittävä etu oli valmiiksi valetut ja trimmatut blokit, joten pääsin aloittamaan työni suoraan mikrotomialla.

Vasta-aineiden joukosta valittiin 11 eniten käytettyä vasta-ainetta. Valintaperusteena oli niiden runsas käyttö. Näytemateriaali oli edustava, sillä siinä oli edustettuna molemmat käytössä olevat puskurit, sekä niiden molemmat ohjelmavariaatiot. Myöhemmin työn edetessä päädyin kokeilemaan kaikkien laboratoriossa käytössä olevien vasta-aineiden toimintaa PT-Modulissa, jolloin vasta-aineiden määrä kohosi 61:een (määrä vuonna 2008). Tällä hetkellä osastolla käytetään noin 90 eri primaarivasta-ainetta.

6.2 Näyteblokkien leikkaaminen

Leikkaaminen aloitettiin alustavasti valituista 11 kontrolliblokkista. Leikepaksuutena käytettiin 2–4 µm riippuen näytteen leikkautuvuudesta. Leikkeet poimittiin mikrotomin terältä pensseleillä, joiden avulla ne vietiin kylmään veteen. Kylmästä vedestä leikkeet poimittiin Superfrost-laseille ja ne suoritettiin lämminvesihauteessa. Tämän jälkeen lasit ilmakeivattiin huoneenlämmössä pystyasennossa. Ilmakeivauksen jälkeen leikkeet kiinnitettiin laseille lämpökaapissa +37 °C:een lämpötilassa yön yli.

6.3 Näytteiden esikäsittely

Näytteiden esikäsittely suoritettiin PT-Modulilla. Esikäsittelyä varten laadin työhöni liittyvän ohjeen (Liite 1), jonka laadinnassa sain apua solubiologi Frimanilta. Esikäsitte-

lyssä käytettiin normaalia esikuumennusta, jonka jälkeen tulevan kuumennusvaiheen olosuhteita muunneltiin optimointivaiheen aikana.

6.3.1 Puskurit

Työssäni käytin puskureina samoja puskureita, kuin laboratoriossa käytetään mikroaal-totekniikan yhteydessä: Tris-HCl-EDTA- (1 mM EDTA/10mM Tris) ja kaupallista sit-raattipuskuria. EDTA-puskuri antaa voimakkaamman käsittelyn ja sen pH on hiukan emäksinen 9.0. Sitraattipuskuria puolestaan käytetään haluttaessa kevyempi käsittely ja sen pH on 6.0. Eri puskureiden sopivuutta vasta-aineille ei tässä työssä tutkittu, sillä rutiinityöskentely ja aiemmat kokemukset ovat osoittaneet, että kyseisten vasta-aine/puskuri-yhdistelmien käyttö on perusteltua.

6.3.2 Esikäsittelyn olosuhteiden optimointi

Solubiologi Frimanin ohjeistuksen mukaisesti lähtökohtana käytettiin lämpötiloja 97 °C, 98 °C ja 99 °C. Aika-asetuksena käytettiin 20 minuuttia, jonka jälkeen kokeiltiin myös 10 ja 30 minuutin aikoja 99 °C:een lämpötilassa. Eri variaatioilla saadut tulokset esitel-lään kappaleessa 7.

Myös skotlantilaisen Grayn tutkimusryhmän käyttämät olosuhteet ovat hyvin lähellä käyttämiäni olosuhteita. Rutiinikäytössä heidän lämpötilansa on 98 °C ja inkubaatioaika 25 minuuttia. Puskuriksi he ovat valinneet Tris-EDTA-puskurin, jonka pH on 8.0. PT-Modulin käytön yhteydessä he ovat luopuneet entsyymikäsittelyistä, kaupallisista esi-käsittelyliuoksista sekä sitraattipuskurin käytöstä. (Gray ym. 2006, 5).

6.4 Näytteiden immunohistokemiallinen värjäys

Värjäykset suoritettiin immunohistokemian värjäysautomaatilla LABVISION 480. Vär-jäyksen suorittamiseen käytettiin osoitusmenetelmää, joka on luotu PowerVision+ TM –kitille. Ohjelmaan on valmiiksi syötetty eri vasta-aineiden ja muiden reagenssien inkubaatioajat, lasien huuhtelut, kuivaukset ja pipetointilavuudet. Käytännössä käsityön

osuus värjäyksessä rajoittui lähinnä vasta-aineiden, reagenssien ja puskureiden valmistukseen ja laimentamiseen. Värjäys noudatti solubiologi Frimanin avustuksella laatimaani ohjetta (Liite 1).

6.5 Värjäystulosten arviointi

Värjäystulosten arvioinnissa saatiin apua solubiologilta, jonka ammattitaitoon tulosten arviointi perustuu. Arviointi oli sanallista, sillä värjäystuloksia on hankalaa arvioida millään absoluuttisella asteikolla. Käytännössä vertailun lähtökohtana oli menetelmän toimivuuden arviointi: saadaanko PT-Modulilla esikäsiteltyjen lasien värjäyksistä yhtä hyviä tuloksia kuin mikroaaltotekniikalla esikäsitellyistä?

Tulosten arvioinnissa tarkkailtiin värjäyksen mahdollista epäspesifistä värjäytymistä, taustan värjäytymistä ja yleensäkin värjäystuloksen tasaisuutta ja voimakkuutta.

7 TUTKIMUSTULOSTEN ARVIOINTI

7.1 Esikäsittelyjen suorittaminen

Optimiolosuhteiden kartoittamiseen käytettiin 11 eniten käytettyä primaarivasta-ainetta. Kirjallisuuden ja työtä ohjaavan solubiologin ennakkotietojen perusteella käytettävät lämpötilat valittiin hyvin läheltä rutiinityöskentelyssä käytettävää 98 °C:een lämpötilaa. Myös aika-asetukset mukailivat hyvin paljon rutiinissa käytettyä 20 minuutin aikaa.

TAULUKKO 1. Käytetyt aika/lämpötila-yhdistelmät

| | 10 minuuttia | 20 minuuttia | 30 minuuttia |
|-------|--------------|--------------|--------------|
| 97 °C | | X | |
| 98 °C | | X | |
| 99 °C | X | X | X |

Kuten taulukosta 1 käy ilmi, matalampaa 97 °C:een lämpötilaa käytettiin vain 20 minuutin aika-asetuksella. Tämän valinnan perusteena oli se, että tahdottiin kokeilla, olisi-ko lämpötilan laskemisella vaikutusta värjäytyvyyteen. 99 °C:een lämpötilaa käytettiin kaikilla eri aika-asetuksilla, koska haluttiin kokeilla parantaako korkeampi lämpötila värjäytyvyyttä. 98 °C:een lämpötila 20 minuutin aika-asetuksella vastaa käytännössä rutiinissa suoritettavaa esikäsittelyä, joten nämä asetukset antoivat parhaan vertailu-materiaalin PT-Modulin käyttömahdollisuuksiin.

TAULUKKO 2. . Optimiolosuhteiden kartoittamiseen käytetyt primaarivasta-aineet

| EDTA-puskuri | | Sitraattipuskuri |
|--------------|---------|------------------|
| CYT 5 | CYT 20 | ER |
| CYT 5/6 | CYT P | PR |
| CYT 7 | MART-1 | HER-2 |
| CYT 14 | MELAN-P | |

Taulukosta 2 käy ilmi primaarivasta-aineet, joilla olosuhteiden toimivuutta kokeiltiin. Jakauma EDTA- ja sitraattipuskurin välillä mukailee käytössä olevien vasta-aineiden jakaumaa, sillä noin ¾ primaari-vasta-aineista on optimoitu EDTA-puskurille.

Esikäsittelyjen optimointi eteni laatimani työohjeen mukaisesti (Liite 1) ja värjäysautomaatin käyttö noudatti Patologian osaston ohjetta.

7.2 Optimointivaiheen värjäysten tarkastelu

Värjäysten tarkasteluun sain apua solubiologilta, joka arvioi värjäysten onnistumista neliportaisella asteikolla. Tulokset on esitelty alla olevassa taulukossa.

TAULUKKO 3. Värjäystulokset: negatiivinen (-), epävarma (+/-), hyvä (+) ja erinomainen (+ +)

| | 97 °C 20min | 98 °C 20min | 99 °C 10min | 99 °C 20min | 99 °C 30min |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| CYT 5 | + | ++ | + | + | + |
| CYT 5/6 | +/- | ++ | + | + | + |
| CYT 7 | + | ++ | + | ++ | + |
| CYT 14 | +/- | ++ | +/- | +/- | +/- |
| CYT 20 | +/- | ++ | +/- | + | + |
| CYT P | +/- | + | - | - | ++ |
| MART-1 | + | + | +/- | +/- | +/- |
| MELAN-P | +/- | +/- | - | + | +/- |
| ER | +/- | ++ | + | + | - |
| PR | + | ++ | - | +/- | +/- |
| HER-2 | - | + | +/- | +/- | + |

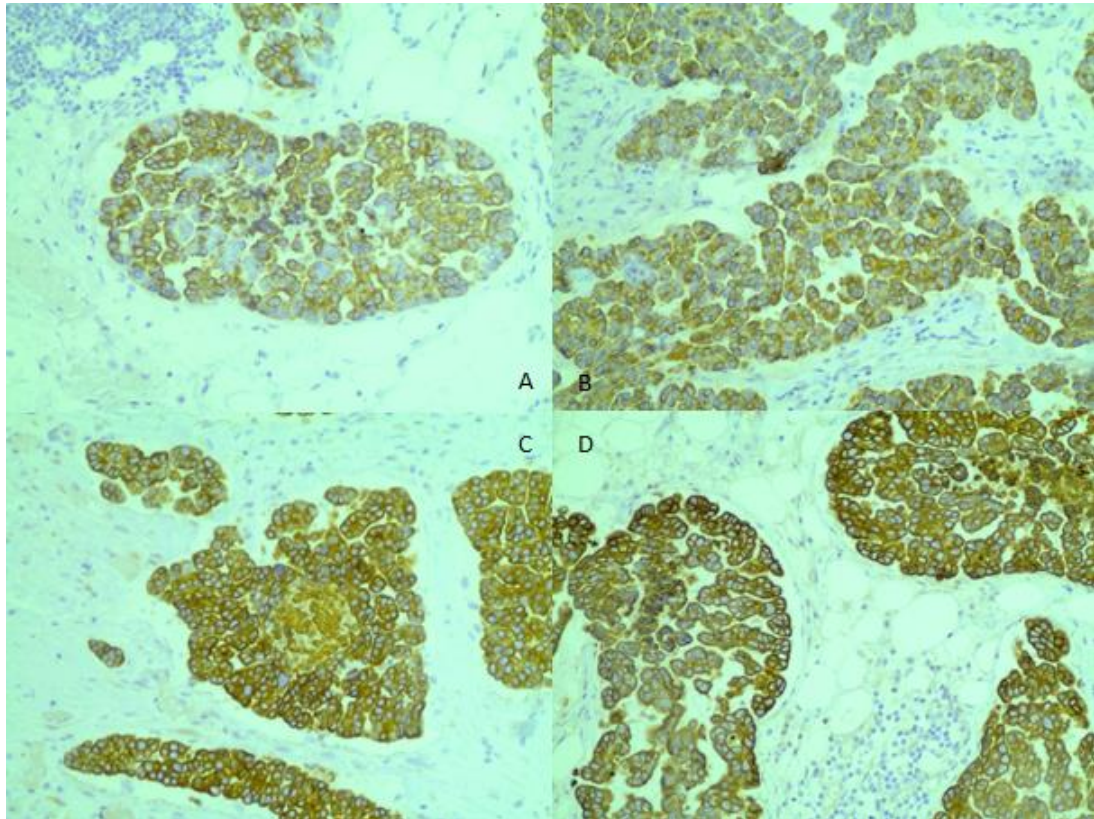
Suurin osa värjäyksistä antoi hyvät tai erinomaiset värjäystulokset 98 °C:een lämpötilassa 20 minuutin aika-asetuksella. Ainoana poikkeuksena on Melan P. Sytokeratiineista kaikki muut paitsi sytokeratiini-pan värjäytyvät erinomaisesti, samoin estrogeeni- (ER) ja progesteronireseptorit (PR).

Madallettaessa lämpötilaa 97 °C:een värjäystulokset heikkenevät merkittävästi: vain 4 vasta-ainetta 11:sta antaa hyvän (+) värjäystuloksen, 6 epävarman tuloksen ja 1 värjäys jää selvästi negatiiviseksi. Tämä havainto vahvistaa selkeästi korkeamman lämpötilan merkitystä.

Nostettaessa lämpötilaa 99 °C:seen havaittiin selvää hajontaa tuloksissa. Kun esikäsitte-
lyn kesto oli 20 minuuttia, tulokset ovat hieman huonompia kuin vertailuolosuhteissa
(20 minuuttia 98 °C:ssa): vain 1 vasta-aine (sytkeratiini 7) antaa erinomaisen, 5 vasta-
ainetta antaa hyvän ja 5 negatiivisen tai epävarman värjäystuloksen. Värjäystuloksen
laatu paranee vertailuolosuhteisiin nähden ainoastaan Melan P-vasta-aineella.

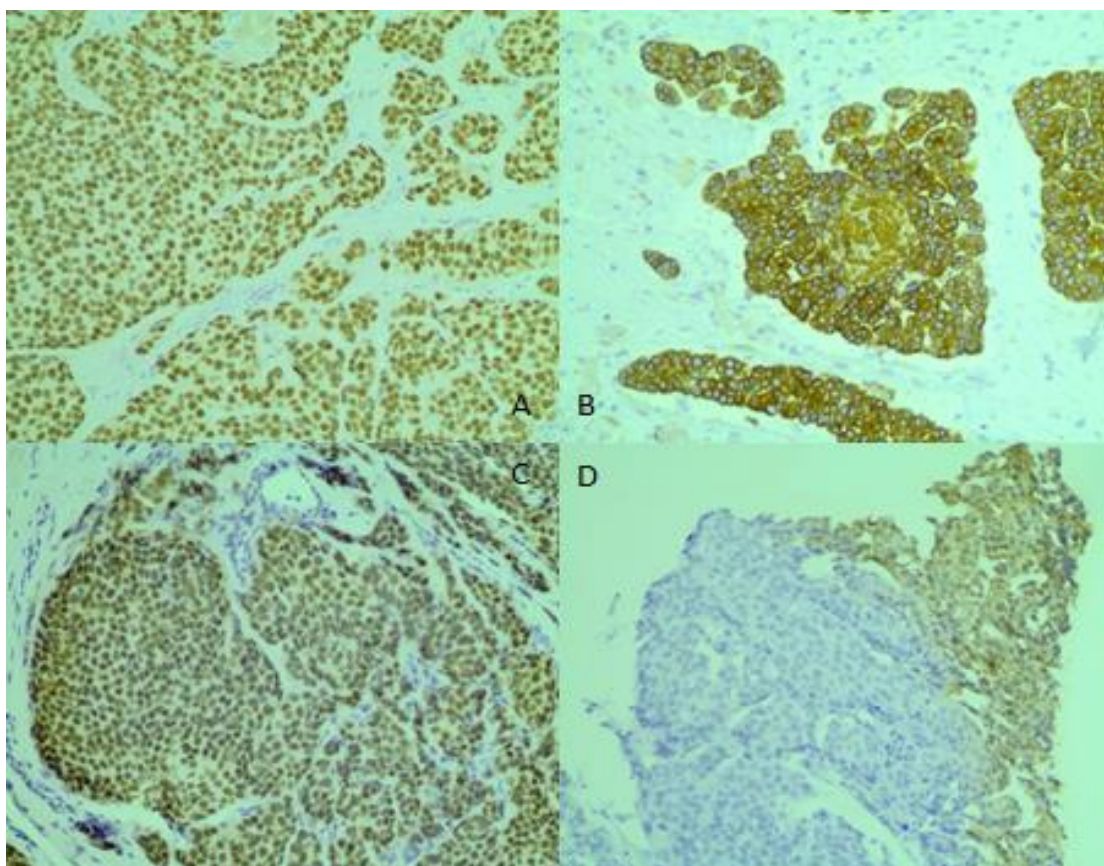
Lyhennettäessä esikäsitteilyn aikaa 10 minuuttiin 99 °C:een lämpötilassa tulokset huo-
nonevat entisestään verrattuna sekä 98 °C:een että 99 °C:een värjäystuloksiin 20 minu-
utin aika-asetuksella. Vain 4 vasta-ainetta antaa hyvän värjäystuloksen ja 7 vasta-ainetta
antaa epävarman tai negatiivisen värjäystuloksen. Näistä 7 huonosta värjäystuloksesta 3
jää negatiiviseksi.

Esikäsitteilyn kestäessä 30 minuuttia 99 °C:een lämpötilassa tulokset ovat hiukan pa-
remmat kuin 10 minuutin aika-asetuksella, mutta kuitenkin selkeästi heikommat kuin 20
minuutin esikäsitteilyillä 98 °C:een ja 99 °C:een lämpötiloissa. 5 vasta-ainetta antaa hy-
vän värjäystuloksen, 4 antaa epävarman ja 1 negatiivisen värjäystuloksen. Yllättäen
sytkeratiini-pan-vasta-aine antaa erinomaisen värjäystuloksen, vaikka normaalisti ky-
seinen sytkeratiini vaatii entsymaattisen käsittelyn pepsiinillä.



KUVA 2. Sytokeratiini 7 värjäykset: A (99 °C 10 min), B (97 °C 20 min), C (98 °C 20 min) ja D (99 °C 30 min) (Manninen)

Kuvasta 2 nähdään erot eri aika-lämpötila-yhdistelmien tuottamista värjäystuloksista. Kuvasta puuttuu värjäys 20 minuutin esikäsittelyllä 99 °C:een lämpötilassa, mutta värjäystulos on yhteneväinen kuvan 2C kanssa. Kuvien 2A ja 2B värjäystulokset ovat selkeästi heikommät, kun puolestaan kuvan 2D näyte on ylivärjäytynyt.



KUVA 3. Estrogeenireseptorivärjäykset (ER): A (97 °C 20 min), B (98 °C 20 min), C (99 °C 10 min) ja D (99 °C 30 min) (Manninen)

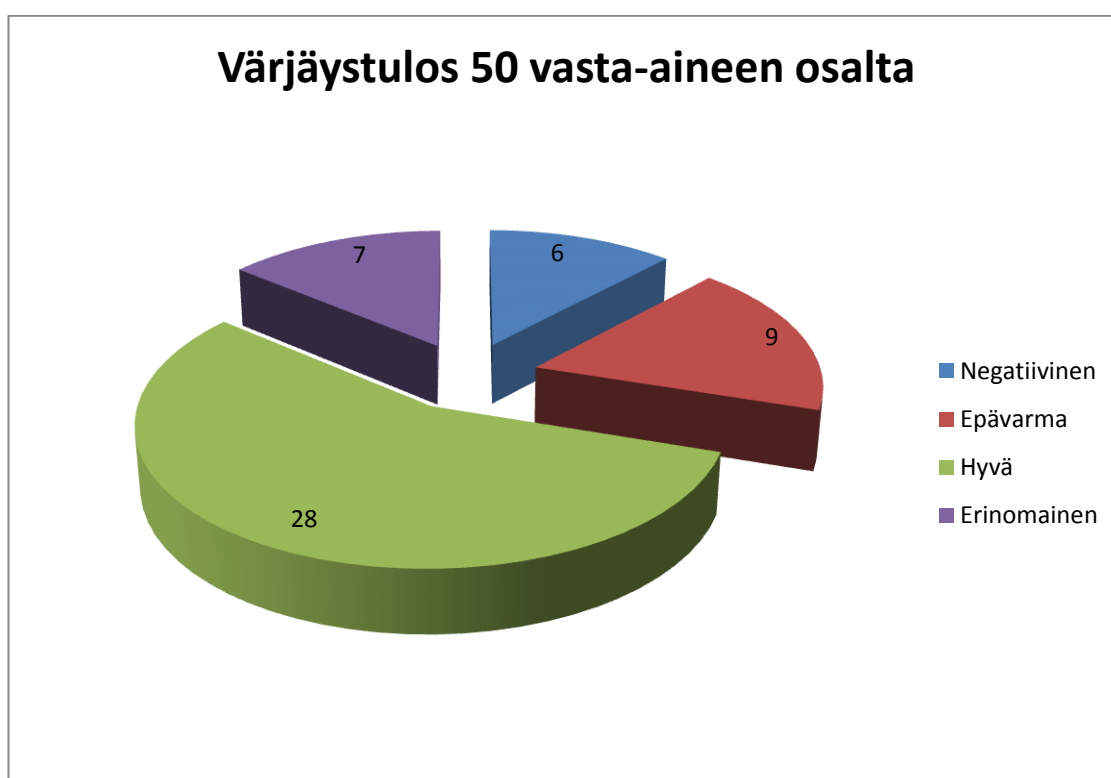
Kuvasta 3 nähdään estrogeenireseptorin värjäykset 4:llä eri aika-lämpötilayhdistelmällä. Kuva 3B on toivotun värjäystuloksen tasolla (98 °C 20 minuuttia). Muut aika-lämpötilayhdistelmät tuottavat huonompia tuloksia. Lisäksi kuvassa 3D nähdään selvä värjäytymätön alue, johon ainoastaan tumaväri on tarttunut. Tämä voi selittyä esimerkiksi ilmakuplalla lasin pinnalla värjäyksen aikana.

7.3 Muiden käytössä olevien vasta-aineiden värjääminen

Optimointivaiheen tulokset osoittavat selkeästi, että paras aika-lämpötila-yhdistelmä on 20 minuuttia 98 °C:een lämpötilassa. Tulokset tällä yhdistelmällä ovat lähes yhtä hyviä kuin rutiinissa käytettävällä mikroaaltouuniteknikalla. Värjätyt 50 vasta-ainetta löytyvät taulukosta 4.

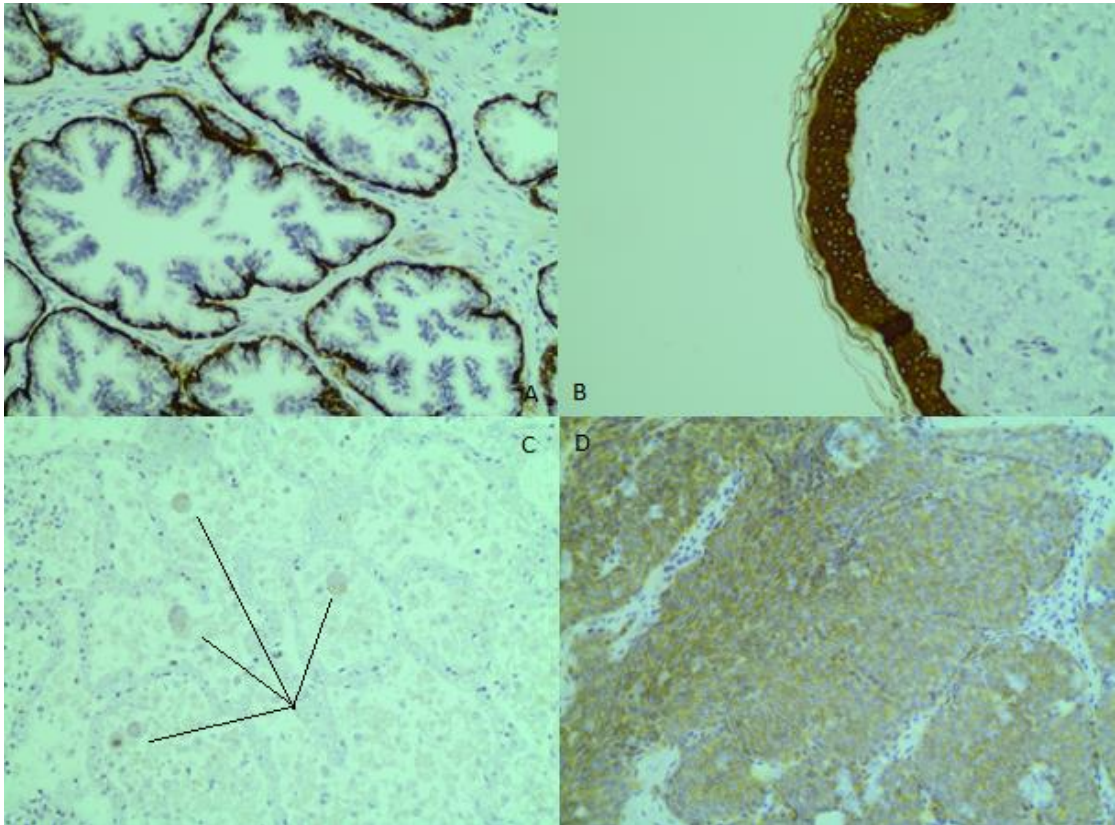
TAULUKKO 4. Täydentävät 50 vasta-ainetta (98 °C 20 minuuttia)

| | | | | | | | |
|------|-------|-----------|------|-------|-------|-------|-------|
| CD3 | CD30 | CD163 | CMV | IgM | EMA | BCL6 | S-100 |
| CD4 | CD34 | GCDFBC-15 | MPO | CVT L | PSA | BCL2 | AMACR |
| CD5 | CD45 | CYCL-D1 | CADE | TTF-1 | CVTH | HMB45 | ACTIN |
| CD8 | CD68 | DESM | AFP | SMM | CALP | NF | HMFG2 |
| CD10 | CD79 | HEPAT | AMV | SMA | HCG | VIM | CGA |
| CD15 | CD117 | ALK/P80 | CALR | PLAP | GLY A | SYP | CEA |
| CD23 | CD138 | | | | | | |



KUVIO 1. Värjäystulokset arvioituna 50 vasta-aineen osalta.

Suurin osa taulukossa 4 mainituista vasta-aineista värjäytyivät hyvin tai erinomaisesti, kuten kuvioista 1 nähdään. Vain 6 vasta-ainetta antoi negatiivisen ja 9 epävarman värjäystuloksen. Prosentuaalisesti negatiivia tai epävarmoja tuloksia oli 30 %.

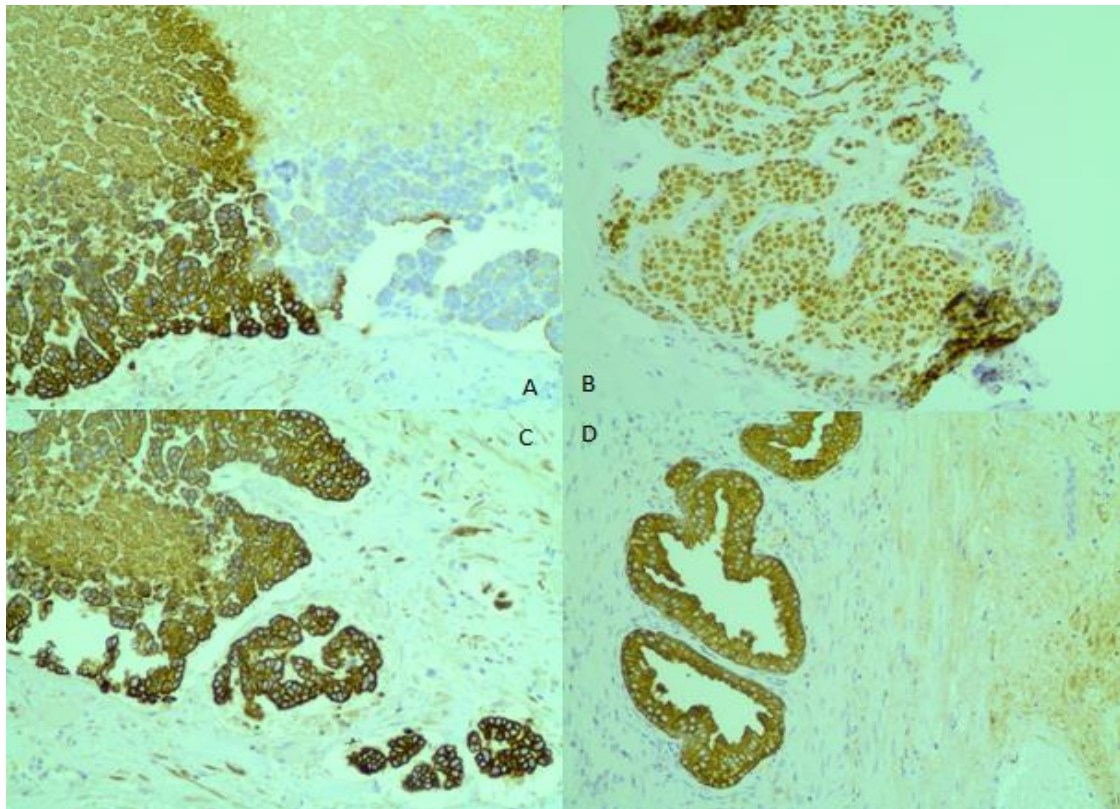


KUVA 4. Esimerkkejä täydentävien 50 vasta-aineen värjäyksistä (98 °C 20 minuuttia)

Kuvassa 4 nähdään sekä erinomaisia, että huonoja värjäystuloksia. Kuvassa 4A nähdään erinomainen värjäystulos sytokeratiini 5:llä, kuvassa 4B puolestaan erinomainen värjäystulos sytokeratiini 20:llä. Kuvassa 4C on negatiiviseksi jäänyt sytomegalovirus-vasta-aineen värjäystulos. Kuvassa 4D nähdään CD117-värjäys, joka vaatii vielä optimointia.

7.4 Havaintoja värjäysten laadusta

Värjäystulosten tarkastelun aikana tuli ilmi muutamia laadullisia tekijöitä, jotka vaikuttavat tulosten tulkintaan. Osa tekijöistä johtuu esimerkiksi kudosblokkien leikkaamisen aikana tapahtuneista asioista, osa puolestaan värjäyskoneesta. Myös huono fiksaatio, epätäydellinen vahanpoisto laskevassa sarjassa ja leikkeiden mekaaninen vaurioituminen heikentävät värjäystuloksia.



KUVA 5. Huonolaatuisia värjäyksiä

Kuvassa 5 nähdään huonolaatuisia värjäyksiä. Kuvassa 5A on kuvattu epätasainen värjäytyminen, joka saattaa johtua esimerkiksi ilmakuplasta joko lasilla tai värjäyskoneen letkuissa. Kuvassa 5B nähdään kahdessa kohdassa näyteblokkien leikkaamisen aikana syntynyttä artefaktaa leikkeen poimuilusta johtuen. Kuvassa 5C nähdään ylivärjäytymistä oikeassa alakulmassa. Kuvan 5D huono laatu johtuu oikean reunan epäspesifisestä taustavärjäytymisestä.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Opetellessani PT-Modulin käyttöä, huomasin, että sen käyttöominaisuudet ovat hyvät. Työturvallisuudesta on huolehdittu, sillä laitetta ei voi käynnistää, ellei kantta ole suljettu asianmukaisesti. Laitteen lämpövastukset eivät ala kuumeta, jos altaissa ei ole tarpeeksi liuosta tai ne ovat tyhjiä. PT-Moduli on erittäin tiivis, joten kuumaa höyryä ei pääse laitteen ulkopuolelle prosessin aikana. Laitteen kantta ei pysty avaamaan prosessin ollessa kesken.

Laatua ajatellen voidaan todeta, että laite tarkkailee jatkuvasti altaassa olevan liuoksen sähkönjohtokykyä, joten liuoksen ionikonsentraation tulee täyttää tietyt vaatimukset. Tästä johtuen altaisiin kaadettu vesi ei mahdollista laitteen käynnistymistä.

Tutkimuksen aikana huomasin, että PT-Modulin käyttö tuo selkeitä mahdollisuuksia kustannussäästöihin. Ensinnäkin samaa puskurierää pystyy käyttämään useamman kerran, koska suljetusta laitteesta ei tapahdu haihtumista. Puskurin teho ei laskenut, eikä pH:ssa tapahtunut muutoksia viidenkään käyttökerran jälkeen. Toinen merkittävä säästökohde on aika. Mikroaaltotekniikkaa käytettäessä mikroaaltouunilla voidaan tehdä vain yksi esikäsittely kerralla. Koska PT-Modulissa on kaksi allasta, se mahdollistaa kahden lämpötila/aika-yhdistelmän toteuttamisen yhden esikäsittelykerran aikana. Tämä säästää selvästi työaikaa.

Tämän tutkimuksen perusteella PT-Moduli soveltuu hyvin käyttöön Keski-Suomen Keskussairaalan patologian laboratorioon. Tässä tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että suurin osa vasta-aineista vaatii vielä optimointia. Työn aikana tehtiin myös mielenkiintoinen havainto koskien sytokeraatiini-pan-vasta-ainetta. Normaalisti kyseinen sytokeraatiini vaatii entsymaattisen pepsiinikäsittelyn, mutta PT-Modulissa antigeenisyyks palautui erittäin hyvin EDTA-esikäsittelyn aikana.

PT-Moduli tarjoaa mahdollisuuksia sekä työajan, että reagenssien säästämiseen. Pelkäämään tämän tutkimuksen perusteella laitetta ei kuitenkaan voida ottaa käyttöön, sillä vasta-ainekohtaista olosuhteiden optimointia tarvitaan huomattavan paljon. Myös työturvallisuuden ja laadun kannalta PT-Moduli on mielestäni hyvä vaihtoehto perinteiselle mikroaaltouunissa tapahtuvalle esikäsittelylle.

LÄHTEET

Aho, H. 1989. Histologiset menetelmät patologiassa. Turku. Turun yliopiston kliinisteoreettinen laitos.

Bancroft, J., Gamble, M. 2002. Theory and practise of histological techniques. 5th edition. London, Churchill Livingstone.

Borley, N.R., Warren, B.F. 2007. Instant pathology. Massachuttes, USA. Blackwell publishing.

Cellpath. Innovation in cellular pathology. <http://www.cellpath.co.uk/tissue-processing-cassettes.381.html> Luettu 14.12.2008.

Dabbs, D. 2006. Immunohistochemistry. 2nd edition. Elsevier. Pittsburgh, USA. 1–37

Franssila, K. 1998. Hyvän immunohistokemiallisen värjäyksen kriteerit. Moodi 1/1998. 20–21

Friman, M. 2008. Suulliset ohjeet opinnäytetyötä varten.

Gray, D., Selbie, D., Cooper, R., Williams, M., Robson, G., Doyle, E. 2006. Simultaneous de-waxing and standardisation of antigen retrieval in immunohistochemistry using commercially available equipment. Immunocytochemistry vol 4 issue 3

Helin, H. 1998. Viisi vuotta immunohistokemian laaduntarkkailua – paraneeko laatu? Moodi 1/1998. 20–21

Kyclová, J., Rotterová, P., Dvořák, K., Lukáš, Z. 2004. Effect of fixation and autolysis on immunohistochemical detection of CD antigens. Masaryk University, Brno.

Manninen, J. 2012. KSSHHP patologian osaston käyntiinpanon ohjeet. Päivitetty 13.7.2012.

Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet: formaldehydi. Työterveyslaitos. 2009. Päivitetty 10.12.2008 <http://www.ttl.fi/ova/formalde.pdf>

Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet: ksyleeni. Työterveyslaitos. 2009. Päivitetty 10.12.2008 <http://www.ttl.fi/ova/ksyleeni.pdf>

Pitkähälme, J., Sappinen, L., Savelius-Lipponen, A. 2007. Mikroaaltouunin soveltuvuus fiksaatioon ja kudosprosessointiin sekä J.F.C-reagenssin sopivuus fiksaatioaineeksi mikroaaltouunimenetelmässä. Bioanalytiikan koulutusohjelma: Helsingin Ammattikorkeakoulu Stadia. Opinnäytetyö.

Rantala, I. 2002. Immunohistokemiallisen värjäyksen herkkyys ja sen parantaminen. Moodi 1/2002. 53–54

Rantala, I., Laasonen, A. 2000. Immunohistokemialliset värjäykset. Moodi 4–5/2000. 148–152

Saranen, M. 2005. Kokemuksia nopeasta mikroaaltokudosprossessorista. Moodi 1/2005. 36–37

Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. 2006. <http://solunetti.fi/fi/histologia/valaminen/>
Luettu 17.5.2009

Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. 2006. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten_vasta-aineiden_tuottaminen/2/)

The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 1994–2008. Histotechniques. <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTOTCH/HISTOTCH.html>
Luettu 21.11.2008

Väkimäki, M.J., Arola, J. 2011. Ruoansulatuskanavan ja haiman neuroendokriiniset kasvaimet. Duodecim. 127(15):1549–59

LIITTEET

Liite 1. PT-Modulin käyttöohje

PT-MODULIN KÄYTTÖOHJE IHK-VÄRJÄYKSISSÄ

1. Laita värjättävät lasit laskevaan sarjaan (28 min)
2. Kytke virta PT-Moduliin oikeasta takakulmasta
3. Avaa PT-Modulin kansi oikealla sivulla olevasta salvasta ja aseta altaat paikoilleen
4. Mittaa altaisiin 1,5 litraa käytettävää puskuria, sulje kansi
5. Käynnistä laite valitsemalla RUN
Laite alkaa lämmittää puskureita asetettuun pre-heat-lämpötilaan. 1,5 litran tilavuutta käytettäessä pre-heat-vaihe vie noin 15 minuuttia.
6. Syötä tiedot laseistasi automaatille (ks. VÄRJÄYSOHJE PowerVision+™-KITILLE)
7. Laskevan sarjan jälkeen huuhtelee laseja UHP-vedessä 3x2 min
8. Aseta lasit kamppoihin siten, että hios/tarrapää on kamman juureen päin, leikepuoli ylöspäin.
9. Avaa laitteen kansi ja aseta kammat paikoilleen. Sulje kansi.
10. Valitse haluamasi lämpötila ja aika
Valitse MENU, valitse 2 (SETUP TIME AND TEMPERATURE) ja tee muutokset. Voit käyttää eri altaissa eri asetuksia. Palaa päävalikkoon valitsemalla DONE ja edelleen oletustilaan valitsemalla DONE.
11. Käynnistä laite painamalla RUN.
Ohjelma alkaa kuumentaa puskureita asetetun ohjelman mukaisesti ja saavutettuaan tavoitelämpötilan inkuboi laseja halutun ajan. Inkubaation loputtua laite jäähdyttää puskurit ja palaa pre-heat-lämpötilaan. Näytöltä voit tarkastaa jäljellä olevan ajan.
12. Laimenna tarvitsemasi vasta-aineet ja vetyperoksidi. Pipetoi myös tarvittava määrä kitin reagensseja. Älä kuitenkaan valmista DAB:ia vielä tässä vaiheessa!!
13. Jos PT-Modulin lämpötila on vielä pre-heat-lämpötilaa korkeampi, voidaan jäähdytystä tehostaa avaamalla laitteen kansi.

Kannen avaaminen: valitse MENU, 1 PAUSE CYCLE, DONE. Kuuluu pieni napsahdus jonka jälkeen kannen voi avata. Paina RESET, jolloin jäähdytys loppuu.

14. Aseta kammat värjäyskoneeseen siten, että kamman juuri tulee taaksepäin ja kampojen koloset uppoavat niille tarkoitettuihin tappeihin.
15. Pipetoi lasille joko UHP-vettä tai PBS-Tweeniä kuivumisen välttämiseksi.
16. Laimenna DAB
17. Aloita immunovärjäys. (MUISTA PRIME!)
18. Sammuta virta PT-Modulista

PT-Modulissa käytettävät puskurit voidaan käyttää kahdesti. Mikäli käytät laitetta seuraavana päivänä uudelleen, säilyy puskuri yön yli altaassa. Tällöin jätä kansi auki. Mikäli et käytä puskuria seuraavana päivänä, nosta allas pois paikoiltaan ja kerää puskurit talteen. Säilytys +4°C.

19. Huuhtelee tyhjät altaat UHP-vedellä ja jätä ne kuivumaan ylösalaisin.
Värjäyksen valmistuttua poista kammat värjäyskoneesta ja pura lasit värjäyskelkkoihin. Muista erotella lasit käytettävän Mayer-laimennoksen mukaan (1+1/1+9). Pidä lasit UHP-vedessä.
20. Suorita tumavärjäys Jungilla ohjelmalla 7 tai 8.
21. Tumavärjäyksen valmistuttua poista lasit Jungista ja päällystä ne Leica CV5030:lla ohjelmalla 2. Tarkista, että peitinlasit ovat pienempää kokoa!
22. Nosta päällystetyt lasit kuivumaan.