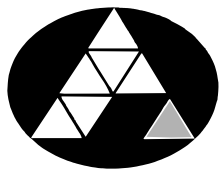


POHJOIS-KARJALAN AMMATTIKORKEAKOULU
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Päivi Rynänen

HUONEENLÄMMÖSSÄ SEKÄ MIKROAALTOUNIMENETELMÄL-
LÄ DEKALSIFIOITUJEN KOVAKUDOSNÄYTTEIDEN VÄRJÄYTY-
VYYDEN VERTAILU

Opinnäytetyö
Marraskuu 2011



POHJOIS-KARJALAN
AMMATTIKORKEAKOULU

OPINNÄYTETYÖ
Marraskuu 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tikkarinne 9
80200JOENSUU
p. (013) 260 600

Tekijä
Päivi Ryyänen

Nimike
Huoneenlämmössä sekä mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioitujen kovakudosnäytteiden värjäytyvyyden vertailu

Toimeksiantaja
Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymän Patologian laboratorio

Kovakudosnäytteen sisältämä kalsium täytyy poistaa luun pehmittämiseksi ja jatkokäsittelyn helpottamiseksi. Dekalsifointiin voidaan käyttää joko happoja tai kelatoivaa liuosta. Etyleenidiamiiniteraetikahappo EDTA on kelaatinmuodostaja eli se sitoo metalli-ioneja, etenkin kalsiumia ja magnesiumia. EDTA-liuoksella dekalsifoinnin etuna on, että se ei vaurioita luun solurakenteita, mutta haittana on sen hitaus. Patologian laboratoriossa kovakudosnäytteen dekalsifointi tapahtuu huoneenlämmössä EDTA liuoksessa.

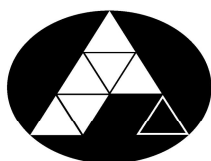
Opinnäytetyössä tutkittiin kuinka mikroaaltouunimenetelmällä tapahtuvan luukudoksen dekalsifointi vaikuttaa näytteen värjäytyvyyteen ja vertailla, eroavatko mikroaaltouunimenetelmällä sekä huoneenlämmössä EDTA-dekalsifioitujen näytteiden värjäytyvyys toisistaan. Tutkimuksessa osa kovakudosnäytteistä dekalsifioitiin huoneenlämmössä EDTA-liuoksessa ja vertailunäytteet mikroaaltouunimenetelmällä EDTA-liuoksessa. Kudokkuljetuksen läpikäyneet kovakudosnäytteet leikattiin ja niille tehtiin hematoksyliini- eosini-, Gomori- sekä Van Gieson-värjäykset.

Huoneenlämmössä dekalsifioitujen näytteiden käsittelyajat vaihtelivat 3-4 viikkoon. Mikroaaltouunimenetelmällä käsiteltyjen näytteiden dekalsifointiaika oli huomattavasti lyhyempi, 6 – 30 tuntia. Värjäytymistä arvioitiin erikseen luukudoksen, luuytimen sekä lihas- ja sidekudoksen osalta. Luu- ja pehmytkudosten osalta arvioitiin yksittäisten solujen sekä tuman erottumista. Vertailunäytteiden ja mikroaaltouunimenetelmällä käsiteltyjen näytteiden solukko värjäytyi hyvin, joten mikroaaltouunitekniikka ei vaikuta kudosten värjäytyvyyteen. Jatkossa voisi tutkia luuytimen dekalsifointia mikroaaltouunitekniikalla.

Kieli
suomi

Sivuja 46
Liitteet 5
Liitesivumäärä 18

Asiasanat
luu, dekalsifointi, mikroaaltouuni, värjäys



NORTH KARELIA
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

THESIS
November 2011
Degree Programme in bioanalytics
Tikkarinne 9
FIN 80200 JOENSUU
FINLAND
Tel. 358-13-260 600

Author

Päivi Ryyänen

Title

Staining Comparison of Hard Tissue Samples Decalcified in Room Temperature and in Microwave Oven

Commissioned by

Joint Municipal Authority for Medical and Social Services in North Karelia, Pathology Laboratory

Abstract

A bone-containing tissue contains some 70 per cent of inorganic compounds, where the main component is calcium phosphate. One of the challenges is to ensure that the decalcification process does not damage the soft issue containing valuable diagnosis information. For example, the process time when using formic acid is short, but it also causes damages in soft issues.

The aim of this thesis was to compare the traditional EDTA decalcification process with microwave accelerated process which speeds up the analysis. One way to speed up the process is to warm up the sample by using ultrasonic waves where the molecules containing water or protein will warm up due to vibration and internal friction.

The thesis was carried out by preparing two sets of samples, one by traditional EDTA method and the second one by using microwave accelerated process. The process time was 3 to 4 weeks when using the traditional EDTA process and between 6 and 30 hours with the ultrasonic warming. This is a remarkable benefit for patient security.

Although the majority of the ultrasound accelerated specimen results were promising and staining of the tissue was good, further studies in order to get stabilised decalcification levels are needed.

Language

Finnish

Keywords

Pages 46

Appendices 5

Pages of Appendices 18

bone, decalcification, microwave, staining

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1	JOHDANTO	5
2	LUUKUDOS	6
3	DEKALSIFIOINTI	8
3.1	Dekalsifiointi reagensseilla	8
3.2	Dekalsifiointi mikroaaltouunimenetelmällä	9
3.3	Dekalsifioitumisen seuranta	10
4	HISTOLOGISEN NÄYTTEEN KÄSITTELY	11
4.1	Histologiset näytteet patologian laboratoriossa	11
4.2	Kudoksen käsittely ja kuljetusprosessi	11
4.3	Leikkeiden valmistus	14
4.4	Leikkeiden värjäys	15
5	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT	16
6	TUTKIMUSMENETELMÄT JA TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	16
6.1	Tutkimusmenetelmä	16
6.2	Tutkimustulosten tilastollinen käsittely	18
6.3	Näytemateriaali	18
6.4	Esitutkimus	19
6.5	Työn toteutus	21
7	TUTKIMUSTULOKSET	23
7.1	Huoneenlämmössä dekalsifioidut näytteet	23
7.2	Mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioidut näytteet	28
8	POHDINTA	32
8.1	Tulosten tarkastelu	32
8.2	Johtopäätökset	36
8.3	Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys	38
8.4	Tutkimuksen hyödynnettävyys sekä jatkotutkimusaiheet	39
	LÄHTEET	40

LIITTEET

Liite 1 Van Gieson- ja Gomori-värjäysten työn suoritusvaiheet

Liite 2 Huoneenlämmössä dekalsifioitujen näytteiden seurantalomake

Liite 3 A- ja B-näytteiden värjäyksen arviointikriteerit sekä arvioinnin toteutus

Liite 4 Huoneenlämmössä dekalsifioitujen A-näytteiden seuranta

Liite 5 Arviointi näytteiden leikkautuvuudesta

1 JOHDANTO

Hyvänlaatuisia luukasvaimia todetaan vuosittain maassamme noin 200 uutta tapausta ja pahanlaatuisia noin 50–60 tapausta. Luutumori on yleisnimitys, jota käytetään yleisimmin natiiviröntgenkuvasta todetusta luumuutoksesta, jonka alkuperä on diagnoosin tekohetkellä osittain tai kokonaan epäselvä. Diagnoosi varmistetaan histologisesti näytepalasta tai muiden lisätutkimusten avulla. Tavallisimpia hyvänlaatuisia luumuutoksia ovat luukystat, osteokondrooma (luurustokasvain) ja luunjättisolukasvain. Pahanlaatuisista luuta muodostavista kasvaimista tärkein on osteosarkooma (luusyöpä), ja luuytimeistä lähtöisin olevia kasvaimia ovat muun muassa lymfoomat (imukudoskasvaimet) ja myeloomat (luuydin kasvaimet). Metastaattiset kasvaimet ovat huomattavasti yleisempiä, sillä primaarisen kasvaimen paikka on yleensä jossain muualla, esimerkiksi rintarauhasessa, eturauhasessa, keuhkoissa tai suolistossa. (Mäkelä 2001, 2205.)

Histologia eli kudospotti tutkii kudosten rakenteita ja niissä tapahtuvia muutoksia. Histologiset näytteet vaativat esikäsittelyä ennen kuin kudorakenteet, erilaisia värjäysmenetelmiä käyttäen, saadaan näkyviin. Histologisten näytteiden tutkimusvälineenä käytetään valomikroskooppia. (Aho 1994, 5.) Kovakudoksen eli luukudoksen sisältämä kalsium täytyy poistaa ennen kuin siitä pystytään tekemään mikroskooppista tarkastelua varten leikkeitä. Huoneenlämmössä tapahtuva kalsiumin poisto eli dekalsifikaatio vie normaalikäytännön mukaan vuorokausista viikkoihin, mutta mikroaaltouunimenetelmällä aikaa kuluu vain tunteja, kovakudosnäytteen koosta riippuen.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia, kuinka mikroaaltouunimenetelmällä tapahtuvan luukudoksen dekalsifointi vaikuttaa näytteen värjäytyvyyteen ja vertailla, eroavatko mikroaaltouunimenetelmällä sekä huoneenlämmössä EDTA-dekalsifioitujen näytteiden värjäytyvyys toisistaan. Opinnäytetyön aiheen sain Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymän patologian laboratorion toimeksiantona.

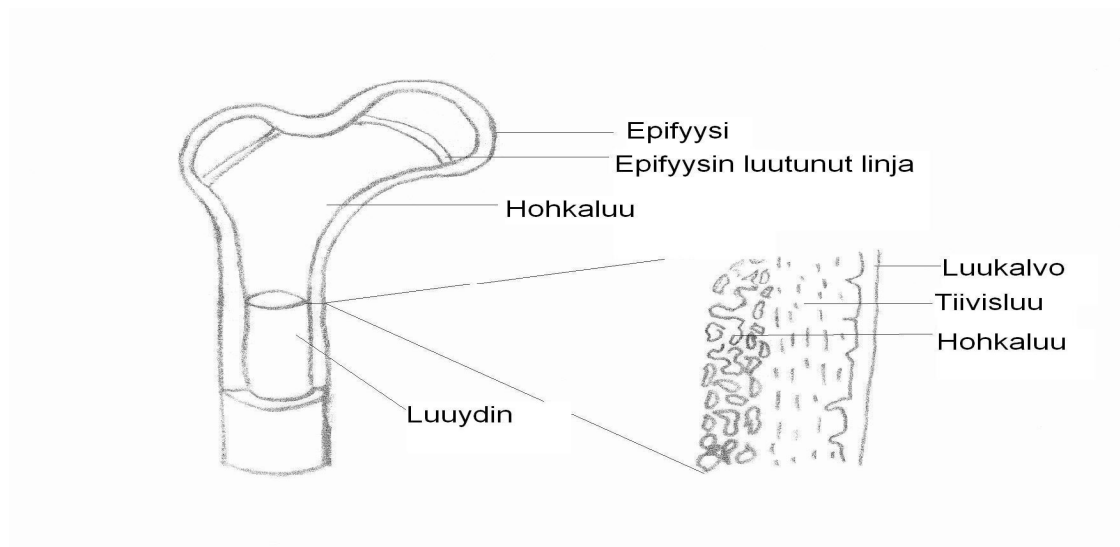
Vastaavia aikaisempia tutkimuksia ei tätä opinnäytetyötä tehdessä löytynyt. Kovakudosnäytteiden dekalsifioinnista mikroaaltouunimenetelmällä löytyy useampia tutkimuksia, mutta kahdella eri menetelmällä dekalsifioitujen näytteiden värjäytyvyyden vertailusta ei löytynyt tutkimuksia.

2 LUUKUDOS

Ihmisen luuranko muodostuu yli 200 erillisestä luusta, ja sillä on useita tehtäviä. Luusto on kehon tukiranka, johon luustolihakset kiinnittyvät jänteillä ja mahdollistavat liikkumisen. Luusto suojelee elintärkeitä elimiä, esimerkiksi rintakehä suojelee sydäntä ja keuhkoja, samoin kuin kallonluut suojelevat aivoja. Luustossa on verta muodostavaa kudosta eli luuydintä, jossa muodostuvat puna- ja valkosolut sekä verihiutaleet. Luusto toimii myös kalsiumin ja muiden kivennäisaineiden varastona, ja sillä on tärkeä merkitys veren kalsiumpitoisuuden säätelyssä. (Chiras 1999, 294.) Luusta noin 70 prosenttia on epäorgaanisia suoloja ja noin 30 prosenttia orgaanisia komponentteja. Epäorgaanisista suoloista suurin osa on kalsiumfosfaattia, josta valtaosa on kiteisenä hydroksiapatiittina. (Callis 2008, 333 – 334.) Kollageenisyyt muodostavat luukudokseen tiheän verkon, jonka ansiosta luukudos on vahvaa ja joustavaa (Nobac, Carola & Van Wynsberghe 1995, 169).

Luut jaetaan niiden koon perusteella putkiluihin (käsissä ja jaloissa), pieniin luihin (ranteissa ja nilkoissa), litteisiin luihin (rintakehässä) sekä epäsäännöllisiin luihin, joita ovat esimerkiksi selkänikamat (Chiras 1999, 294). Luukudos voidaan jakaa kahteen perustyyppiin, kompakti eli tiivisluuhun ja hohkaluuhun. Tiivisluu on kiinteää, kovaa ja erittäin vahvaa luuta, joka muodostaa pitkien luiden, esimerkiksi reisiluiden ja sääriluiden, varret sekä muiden luiden pinnat. Hohkaluu on rakenteeltaan verkkomainen, ja sitä löytyy esimerkiksi pitkien luiden varresta ja päistä sekä selkänikamista. (Callis 2008, 333.) Hohkaluu muodostuu pienistä onkaloista, joissa on verisuonia, hermostoa ja punaista luuydintä. Pitkän luun, esimerkiksi reisiluun, sisällä on luuydinkanava, jossa on punaista luuydintä, missä verisolut muodostuvat. Iän myötä punaisen luuytimen tilalle muo-

dostuu keltaista luuydintä, mutta aikuisen verisolujen muodostumisesta huolehtii litteiden luiden luuydin, kuten esimerkiksi lonkkaluu. Joissakin olosuhteissa keltainen luuydin voi muodostaa verisoluja, esimerkiksi vamman seurauksena. (Chiras 1999, 295–296.) Kuvassa 1 on putkiluun rakenne.



Kuva 1. Putkiluun luun rakenne (Ryynänen 2011, mukaillen eri lähteistä)

Luukudos muodostuu useista perustyyppin soluista, jotka kykenevät muuntautumaan elimistön tarpeiden mukaan. Trauman sattuessa nämä solut aloittavat paranemisprosessin. Osteoblastit muodostavat luun väliaineen eli matriksin ja huolehtivat sen mineralisaatiosta. Osteoblasteja löytyy kasvavasta osasta luuta ja periosteumin eli luuta päällystävän sidekudoskalvon sisäosista. Osa osteoblasteista kasvaa muodostamansa luuväliaineen sisään, jonka jälkeen niitä kutsutaan osteosyyteiksi. (Callis 2008, 334.)

Osteosyytit ovat kypsiä luusoluja, jotka muodostavat laguunimaisia ulokkeita ja ovat yhteydessä toisiinsa pienissä kanavissa kulkevien solu-ulokkeiden välityksellä. Osteosyytit muodostavat uutta luuta ja osallistuvat osteoklastien kanssa homeostaasiin vapauttamalla kalsiumia luukudoksesta vereen säätelemällä siten kalsiumin tasapainoa elimistön nesteissä. (Nobac ym.1995, 163.)

Osteoklastit ovat suuria, monitumaisia soluja, jotka huolehtivat luun hajottamisesta eli resorptiosta (Callis 2008, 334). Osteoklastit polveutuvat monosyyttilinjän kantasolusta ja erilaistuessaan osteoblastit muuntuvat ostosyyteiksi tai luun pintasoluiksi. Luun pintasolut sijaitsevat aivan luun pinnassa muodostaen sen uloimman solukerroksen. Luun pintasolut säätelevät kalsiumin ja fosfaattien kulkeutumista luuhun ja sieltä ulos. (Nobac ym.1995, 163.)

Pahanlaatuisista, luuta muodostavista kasvaimista tärkein on osteosarkooma, ja luuytimeistä lähtöisin olevia kasvaimia ovat muun muassa lymfoomat ja myelooma. Luukasvaimet jaetaan hyvän- ja pahanlaatuisiin sekä edelleen primaariin ja metastaattisiin eli sekundaarisiin luukasvaimiin. Metastaattiset luukasvaimet ovat huomattavasti tavallisempia, jolloin primaarisen kasvaimen paikka on jossain muualla elimistössä. (Mäkelä 2001, 2205–2210.)

3 DEKALSIFIOINTI

3.1 Dekalsifointi reagensseilla

Luukudos vaatii käsittelyä ennen kuin siitä pystytään tekemään mikroskooppista tarkastelua varten leikkeitä. Luukudoksen sisältämä kalsium täytyy poistaa luun pehmittämiseksi ja jatkokäsittelyn helpottamiseksi. Dekalsifointi eli kalsiumin poisto tehdään reagensseilla, jotka reagoivat kalsiumin kanssa. (Alers, Krijtenburg, Vissers & Dekken 1999, 703.) Vahvat hapot, esimerkiksi 5-10-prosenttinen typpi- tai suolahappo, poistavat kalsiumia nopeasti, mutta voivat vahingoittaa luukudoksen rakennetta. Vahvoja happoja käytetään pienten luunäytteiden dekalsifioinnissa silloin, kun näytteestä halutaan vastaus nopeasti. (Callis 2008, 339.)

Heikoista hapoista muurahaishappo 5-10-prosenttisena liuoksena on laajalti käytetty dekalsifioinnissa, mutta myös muurahaishapon ja formaliinin seosta käytetään. Etikka- ja pikriinihapoilla on heikko kalsiumia poistava ominaisuus, ja niitä käytetään luusolukon pehmittämisessä yhdessä formaliinin kanssa. Heik-

koja happoja käytetään pienten näytepalojen dekalsifioinnissa, johon kuluu 1-10 päivää riippuen näytteen koosta, kalsiumin määrästä, luun tyypistä ja happokonsentraatiosta. Dekalsifioitumisen pysäyttämiseksi hapot poistetaan kudoksesta neutraloimalla ne kemiallisesti tai huuhtelemalla ne vedellä. Kudosnäytteissä oleva happojäännös voi vahingoittaa mikrotomin metallisia veitsiä. (Callis 2008, 339, 343.)

Etyleenidiamiiniteraetikkahappo eli EDTA on kelaatinmuodostaja eli se sitoo metalli-ioneja, etenkin kalsiumia ja magnesiumia. EDTA:n kalsiumia sitova ominaisuus on parhaimmillaan pH:n ollessa 7-7.4. Luukudosta voidaan dekalsifoida EDTA:ssa useita päiviä tai viikkoja solurakenteita vahingoittamatta. Dekalsifioitumisen nopeuteen vaikuttavat näytteen koko sekä mineralisaation taso. (Callis 2008, 339–340.)

3.2 Dekalsifointi mikroaaltouunimenetelmällä

Eryityisesti kudokäsittelyä varten suunnitellut mikroaaltouunit lyhentävät dekalsifointia tunneista minuutteihin (Bancroft & Spencer 2008b, 88). Elizabeth Keithleyn, Tim Truongin, Brandy Chantronaitin ja Peter Billingsin vuonna 2001 tekemässä tutkimuksessa ”Using the Microwave oven for Decalcification of Human Temporal Bones” osoitettiin mikroaaltouunikäsittelyn nopeuttavan kovakudosnäytteen dekalsifointia (Keithley, Truong, Chantronait & Billings 2001).

Mikroaallot ovat sähkömagneettisia aaltoja, joiden aallonpituus vaihtelee 1m:n ja 1mm:n eli 300 MHz:n – 300 GHz:n välillä (Boon & Kok 1992, 4). Mikroaaltojen lämpöä tuottava ominaisuus kohdistuu vesi- sekä proteiinipitoisten materiaalien molekyyleihin, missä mikroaaltojen aikaansaama värähtely synnyttää molekyylien välille kitkaa, muodostaen lämpöä (Nyberg & Jokela 2006, 439). Laboratoriokäytössä olevissa mikroaaltouuneissa on tarkat lämpötilaa ja aikaa seuraavat ajastimet sekä haitallisten kaasujen poistojärjestelmät. Prosessiin kulunut aika on riippuvainen näytteen laadusta eli kuinka paksusta ja sitkeästä kudoksesta on kysymys. Laboratoriokäytössä olevat mikroaaltouunit ovat joko täysin automatisoituja tai manuaalisia, joissa näytteet siirretään käsin liuoksesta toi-

seen. Mikroaaltostimulaatio nostaa kudoksen sisäistä lämpötilaa ja nopeuttaa liuosten diffuusiota. (Bancroft & Spencer 2008b, 88.) Diffuusiassa molekyylit pyrkivät siirtymään väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan tasoittaen pitoisuuseroja (Lehtonen, Jaarinen, Johansson, Pohjakallio & Repo 2004, 107).

3.3 Dekalsifioitumisen seuranta

Dekalsifioitumista seurataan erilaisilla päätepestesteillä. Päätepestesteillä seurataan luun pehmenemistä. Päätepestestejä ovat esimerkiksi kalsiumoksaalaatti- ja neulatesti. Kun käytetään kalsiumin poistoon vahvoja happoja, kuten typpi- tai suolahappoa, suositellaan päivittäisiä testejä. Dekalsifioitumisen edetessä testejä suositellaan tehtäväksi useammin, jopa viiden tunnin välein. Kun käytetään EDTA-liuosta, päätepestesti voidaan tehdä liuoksen vaihdon yhteydessä ja lisätä testauskertoja dekalssifioitumisen edetessä. Pienten biopsianäytteiden käsittely vahvoilla hapoilla voi johtaa siihen, että päätepestesti voidaan suorittaa vain kerran, että näyte ei tuhoutuisi. (Callis 2008, 341.)

Kalsiumoksaalaattitesti osoittaa kalsiumin läsnäolon happoliuoksessa saostamalla kalsiumin. Happoliuos neutralisoidaan ammoniumhydroksipaatilla pH 7 ja sekoitetaan hyvin. Liuoksen annetaan seistä 30 minuuttia, jonka aikana kalsium saostuu, tai jos kalsiumia ei ole läsnä, liuos jää kirkkaaksi. Kuplatestissä happo reagoi kalsiumkarbonaatin kanssa muodostamalla kalsiumia sisältävän näytteen ympärille hiilidioksidikuplia. Kuplat häviävät sekoittamalla liuosta, mutta muodostuvat uudelleen reagoidessaan kalsiumin kanssa. Hiilidioksidikuplat pienenevät, ja niitä muodostuu vähemmän dekalssifioitumisen edetessä. Kuplatesti on epävarma ja on riippuvainen testin havainnoijasta. Kun käytetään röntgenkuvausta, näytteiden kuvaus täytyy tehdä ennen dekalssifioinnin aloittamista, jolloin saadaan vertailukohta kalsiumin poistumiseksi luunäytteestä. Röntgenkuvaus selvittää syvemmällä näytteessä tapahtuvan dekalssifioitumisen etenemisen, ja se vahingoittaa kudoksenäytteitä vähiten. Fysikaalisista testeistä neulatesti on yleisimmin käytössä. Neulalla koetellaan kudoksen kovuutta tasaisin väliajoin dekalssifioitumisen edetessä. Haittana tässä testissä on kudoksen vahingoittuminen. (Callis 2008, 342.)

4 HISTOLOGISEN NÄYTTEEN KÄSITTELY

4.1 Histologiset näytteet patologian laboratoriossa

Histologisia kudoksenäytteitä saadaan leikkauksissa, lyhytkirurgisissa toimenpiteissä, endoskopiaissa paksu- ja ohutneulanäytteinä sekä ruumiinavauksista (Huhtakallio 1995, 14–15). Saapuvien näytteiden koko voi vaihdella pienistä biopsia näytteistä suuriin, kokonaan poistettuihin ruumiinosiin (Billings & Grizzle 2008, 75). Saapuvat näytteet lajitellaan, sisään kirjataan laboratoriojärjestelmään ja niille annetaan näyttenumero. Saapuneista näytteistä mikroskooppisen näytteen käsittelyn valmistelee bioanalytiikka, mutta patologi suorittaa makroskooppisten näytteiden tutkimuksen ja leikkaamisen eli dissekoinnin. (Huhtakallio 1995, 14–15.) Lajitellut näytteet säilytetään 10-prosenttisessä formaliinivesiliuoksessa, jonka tehtävänä on fiksoida eli kiinnittää kudokset jatkokäsittelyä varten (Aho 1994, 6).

Luunäytteet saapuvat laboratorioon erikokoisina näytepaloina, formaliinia sisältävässä näyteastioissa. Niiden koko vaihtelee muutaman millimetrin kokoisista neulabiopsioista suuriin amputoituihin raajoihin. (Callis 2008, 335.) Luunäyte voidaan ottaa leikkauksen yhteydessä tai erillisenä toimenpiteenä erityisellä luubiopsianeulalla. Luun pinta lävistetään lieriömäisellä, kärjestään leikkaavalla neulalla, jonka jälkeen luusta saadaan poramaisella terällä näyte luusta. (Tikka-koski, Lähde, Puranen & Apaja-Sarkkinen 1993, 119.)

4.2 Kudoksen käsittely ja kuljetusprosessi

Kiinteät kudokset tarvitsevat käsittelyä, joka kovettaa ja säilyttää kudoksen rakenteita siten, että kudoksesta voidaan tehdä ohuita leikkeitä värjäystä ja mikroskooppista arviointia varten (Morales, Nassiri, Kanhoush, Vincek & Nadji 2004, 528). Kudosten käsittely tehdään kuduskuljetusautomaatilla. Kuduskuljetusprosessi muodostuu fiksaatiosta eli kudoksen kiinnittämisestä, dehydratiosta eli veden poistosta, kudoksen kirkastamisesta ja tukiaineeseen imeyttämisestä

(Bancroft & Spencer 2008b, 84). Fiksaation tarkoituksena on pysäyttää kudoksen autolyysi eli hajoaminen entsyymien ja bakteerien vaikutuksesta sekä säilyttää kudosten morfologia mahdollisimman lähellä alkuperäistä rakennetta. Fiksaatiossa käytetään formaliinia 10 prosenttina puskuroituna laimennoksena, jonka formaliini pitoisuus on noin 4 prosenttia. (Grizzle, Fredenburgh & Myers 2008, 54.)

Dehydroimalla poistetaan kudoksen sisältämä vesi. Liiallinen dehydraatio saattaa tehdä kudokset koviksi sekä hauriksi. Epätäydellinen vedenpoisto taas estää kirkastuksessa käytettävien liuosten imeytymisen kudoksiin ja jättää kudoksen pehmeäksi. Dehydointiin voidaan käyttää useita liuoksia esimerkiksi etanoli, metanoli, asetoni ja butanoli, mutta etanoli on yleisimmin kudoksenäytteiden dehydraatiossa käytetty liuos. Etanoli on kirkas, väritön ja herkästi syttyvä neste ja hydrofiilisenä eli vesihakuisena sekoittuu hyvin veteen ja muihin orgaanisiin yhdisteisiin. (Bancroft & Spencer 2008b, 85.) Kudoksiin sitoutunut vesi poistetaan pitoisuudeltaan nousevalla alkoholisarjalla. Dehydointi aloitetaan 50–70 prosenttisella etanolilla, ja lopuksi kudokseen imeytetään absoluuttinen etanoli, jolloin kudoksesta on täysin vedetön. (Kaila 1998, 14.)

Etanoli poistetaan kudoksista kirkastusreagenssilla, jonka on oltava ominaisuuksiltaan sellainen, että se sekoittuu dehydroivan reagenssin sekä tukiaineen kanssa (Bancroft & Spencer 2008b, 85). Etanoli on poistettava kudoksenäytteistä, koska parafiini ja etanoli eivät ole liukoisia keskenään. Dimetyylilibentseeneistä koostuva ksyleeni on yleisimmin käytetty kirkastusreagenssi ja tekee kudoksenäytteistä läpikuultavia eli kirkastaa kudoksen. (Aho 1994, 13.)

Kirkastuksen jälkeen kudokseen imeytetään parafiini, joka tukee kudoksenäytettä ja helpottaa näytteiden jatkokäsittelyä. Parafiini on mineraaliöljypohjainen vaha, joka muodostuu pitkistä hiilivetyketjuista. Parafiinin sulamispiste vaihtelee 40–70 °C:n välillä riippuen siihen lisätyistä aineista. (Bancroft & Spencer 2008b, 86.) Hiilivetyketjut aggregoituvat eli kasautuvat huoneenlämmössä kiteiksi kudoksen rakenteisiin ja muodostavat parafiinilla kyllästettyjen kudosten tuen. Parafiini imeytetään kudoksiin kuljetusautomaatissa sen sulamispistettä korke-

ammassa lämpötilassa sekä alipaineessa, jolloin se tunkeutuu kudoksiin ja jäähtyessään kiinteytyy kudoksissa. (Kaila 1998, 16–17.)

Täysin automatisoiduissa kuduskuljetusautomaateissa näytteet laitetaan kammioon, jossa ne ovat koko kuduskuljetuksen ajan. Reagenssit ja sula parafiini kierrätetään kammion kautta käyttäen hyväksi yli- ja alipainetta. Lämpötilaa voidaan säädellä eri kudoksille tarkoitettujen ohjelmien mukaan. (Bancroft & Spencer 2008b, 88.) Lämpötilan nosto nopeuttaa kuduskuljetusprosessissa käytettävien liuosten imeytymistä kudoksiin ja auttaa liuoksia parempaan kosketukseen kudoksen eri osien kanssa. Alipaine taas tehostaa sulan parafiinin tunkeutumista kudoksiin. (Kaila 1998, 18–19.) Kuduskuljetusprosessinaikatauluja mukautetaan kudostyyppiin ja koon, käytettyjen reagenssien, lämpötilan, paineen ja tyhjiön mukaan (Bancroft & Spencer 2008b, 89). Taulukossa 1 on esimerkki tyhjiökudosprosessoreissa käytetyistä kuduskuljetusprosessinohjelmista (Rohr, Layfield, Wallin & Hardy 2001, 704.)

Taulukko 1. Yön yli kuduskuljetusprosessi pienille ja suurille näytteille (Rohr ym. 2001, 704)

Lämpötila ja reagenssit	Pienet näytteet, fiksaatioaika min	Suuret näytteet, fiksaatioaika min
Lämpötila 40 °C		
Formaliini	60	60
Formaliini	60	60
70 % alkoholi	20	45
95 % alkoholi	30	45
95 % alkoholi	30	60
100 % alkoholi	30	45
100 % alkoholi	30	45
100 % alkoholi	30	60
Xyleni	30	60
Xyleni	30	60
Lämpötila 60 °C		
Parafiini	10	30
Parafiini	20	30
Parafiini	10	30
Parafiini	20	20
Aika	8 tuntia	12 tuntia

4.3 Leikkeiden valmistus

Kudoskuljetusprosessin läpikäyneet kudospalat siirretään kasetista valumuottiin leikkauspinta alaspäin ja päälle valutetaan sula parafiini (Aho 1994, 14). Valumuotilla valmistettu parafiiniblokki jäähdytetään, jonka jälkeen siitä voidaan leikata mikrotomilla 2 – 5 µm:n paksuisia leikkeitä (Callis 2008, 344).

Toimintaperiaatteeltaan erilaisia mikrotomeja ovat rotaatio-, kelkka- ja liukumikrotomi. Rotaatiomikrotomissa veitsi pysyy paikallaan, ja näyteblokki liikkuu pystysuunnassa veitseen nähden. Kelkkamikrotomissa näyte asetetaan kelkkaan, joka liukuu paikallaan pysyvän veitsen alta. Liukumikrotomissa näyteblokki pysyy paikallaan, ja veitsi liukuu näyteblokin yli. (Bancroft & Spencer 2008a, 93.) Mikrotomissa käytetyt veitset on valmistettu karkaistusta teräksestä, ja niiden kovuus ilmaistaan Vickers-yksikköinä. Veitsien kovuus vaihtelee 400–900 Vickersiin. Tavallisin käytössä oleva veitsi on kovuudeltaan 700 Vickersiä, ja soveltuu useammanlaisten kudoksenäytteiden leikkaamiseen. Mikrotomiveitset ovat kertakäyttöisiä, mutta niillä voidaan leikata useita kymmeniä leikkeitä näytekudoksen kovuudesta riippuen. (Aho 1994, 15.)

Parafiiniblokista poistetaan mikrotomilla ylimääräinen parafiini pois, jolloin saadaan leikattava pinta näkyviin. Näytteestä leikataan useita leikkeitä, jotka siirretään kylmävesihauteeseen. Kylmävesihauteessa leikkeiden rypyt ja laskokset suoritetaan pensseliä apuna käyttäen, ja ne uitetaan objektilasille. Kuumavesihauteessa kudosta ympäröivä parafiini pehmenee, jolloin leikkeitä voidaan vielä suoristaa. Objektilasin huurrettuun päähän kirjataan näytenumero tai jokin muu tunniste näytettä varten. (Bancroft & Spencer 2008a, 95–96.)

Päivittäisessä käytössä olevat objektilasit ovat erikoiskirkasta lasia. Objektilasin huurrettu pää voi olla värillinen, ja toimia koodina, jos jokin näyte tarvitsee esimerkiksi erikoisvärjäystä. Laboratorioissa on käytössä plusobjektilaseja, joiden pinta on käsitelty siten, että niissä on pysyvä positiivinen varaus. Varauksen tarkoituksena on kiinnittää kudoksenäyte paremmin kiinni objektilasin pintaan. (Bancroft & Spencer 2008a, 95–96.) Esimerkiksi luusta tehty leike pysyy kiinni plussalasilta parhaiten värjäyksen aikana (Callis 2008, 344).

4.4 Leikkeiden värjäys

Ennen mikroskooppista tarkastelua näytteet on värjättävä, jolloin saadaan näkyviin eri solujen osat sekä pystytään erottelemaan eri kudostyyppit. Värjäystä varten parafiini poistetaan näytelasilla olevasta leikkeestä ksyleenillä ja hydrolysoidaan laskevassa alkoholisarjassa. Laskevalla alkoholisarjalla tarkoitetaan liuosväkevyyden laimenemista väkevämmästä laimeampaan. Leikkeet voidaan värjätä koneellisesti, jolloin objektilasit siirtyvät automaattisesti liuoksesta toiseen tai niille tehdään erikoisvärjäykset käsin. Värjätyt leikkeet käsitellään päällystysaineella peitinlasin kiinnittämiseksi. (Aho 1994, 16.) Käsin tehtävien Van Gieson- ja Gomori-värjäysten työn suoritusvaiheet ovat liitteessä 1.

Hematoksyliini-eosiinivärjäys on eniten käytetty yleisvärjäys histologisille näytteille (Gamble 2008, 121). Hematoksyliiniä saadaan kuumalla vedellä uuttamalla Haematoxylon campechianum-puusta, mutta vasta hapetuksen jälkeen muodostuva hapetustuote hemateiini toimii värinä. Hemateiini tarvitsee kudokseen sitoutuakseen peittausaineen, joita ovat esimerkiksi alumiinin ja raudan suolat. Hematoksyliini on tumaväri, joka värjää tumien nukleiinihapot sinisenmustan eri sävyin. Eosiini on hapan väri, joka värjää solujen sytoplasmat vaalean ja tumman punaisin eri värein. (Burkitt, Young & Heath 1996, 400.) Käsin tehtävän hematoksyliini-eosiinivärjäyksen työn suoritusvaiheet ovat liitteenä 1.

Weigert-Van Gieson-värjäys soveltuu sidekudosten värjäykseen. Sidekudosvärit värjäävät kollageenia, lihassoluja ja sytoplasmaa. Kollageenityyppejä on useita, ja esimerkiksi luun matrix muodostuu kollageenityypin I kollageenista. Van Gieson-väriaineista pikriinihappo värjää lihaksen, soluliman ja fibriinin kellertäväksi. Fuksiini taas värjää sidekudoksen kollageenin punaiseksi. Tumavärinä Van Gieson-värjäyksessä toimii Weigertin rautahematosykliini, mutta tumavärinä tämä ei ole hematosykliini-eosiinivärjäyksen veroinen. (Aho 1994, 33–34.) Käsin tehtävän Weigert-Van Gieson-värjäyksen työn suoritusvaiheet ovat liitteenä 1.

Gomori-värjäyksessä eri värjäysvaiheiden kautta retikuliinisäikeet sekä tumat värjäytyvät mustiksi. Lihas sekä kollageeni värjäytyvät harmaiksi, mutta elastiini ei värjäydy lainkaan. (Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä patologian yksikön toimintakäsikirja 2008, 6.) Retikuliinin säikeet ovat

hienojakoisia säikeitä, jotka koostuvat kollageenityyppi III:sta. Sitä esiintyy runsassoluisissa elimissä, esimerkiksi pernassa, maksassa sekä imusolmukkeissa. Kollageenityypin III:n esiintyminen liittyy useisiin sairauksiin, esimerkiksi maksa-
kirroosiin, moniin leukemian muotoihin sekä luuytimen sairauksiin. Retikulii-
nisäikeet ryhmittyvät kasvainsolujen ympärille ja ovat siten avuksi kasvainten
luokittelussa. (Aho 1994, 35.) Käsin tehtävän Gomori-värjäyksen työn suoritus-
vaiheet ovat liitteenä 1.

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT

Luukudoksen eli kovakudosnäytteen dekalsifointiin EDTA-reagenssilla kuluu useista vuorokausista viikkoihin, mutta mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifointiaikaa voidaan oleellisesti lyhentää. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia, kuinka mikroaaltouunimenetelmällä tapahtuvan luukudoksen dekalsifointi vaikuttaa kovakudosnäytteen värjäytyvyyteen ja vertailla, eroavatko mikroaaltouunimenetelmällä sekä huoneenlämmössä EDTA-dekalsifioitujen kovakudosnäytteiden värjäytyvyys toisistaan.

Tutkimusongelmat

1. Miten mikroaaltouunimenetelmällä tapahtuva kovakudoksen dekalsifointi vaikuttaa kovakudosnäytteen värjäytyvyyteen?
2. Eroaako mikroaaltouunimenetelmällä ja huoneenlämmössä EDTA-dekalsifioitujen näytteiden värjäytyvyys toisistaan?

6 TUTKIMUSMENETELMÄT JA TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

6.1 Tutkimusmenetelmä

Kvantitatiivisen tutkimuksen peruseriaatteisiin kuuluu tehdä johtopäätöksiä aikaisemmista tutkimuksista ja teorioista sekä määritellä käsitteitä. Tutkimus-

suunnitelman ja koejärjestelyin saatu havaintoaineisto soveltuu määrälliseen eli numeeriseen mittaamiseen. Päätelmät tehdään tutkimuksen tuloksena saatujen muuttujien taulukoinnin ja tilastollisesti käsiteltyjen tulosten pohjalta. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2008, 136.) Kvantitatiivisen tutkimuksen aineisto voidaan saada jo olemassa olevista tilastoista ja rekistereistä tai se voidaan kerätä itse (Heikkilä 2004, 18). Itse kerätyn aineiston hankinnassa tutkijan on päätettävä, miten tieto kerätään sekä kerättävän tiedon määrä. Aineiston koko on osattava rajata käytettävien resurssien ja ajan käytön mukaan, mutta aineiston on oltava tutkimuksen luotettavuuden kannalta riittävä. (Hirsjärvi ym. 2008, 164–166.) Tätä opinnäytetyötä varten tutkimusmateriaalia oli käytössä rajallisesti, mutta näytemäärä oli riittävä tutkimuksen tarpeisiin.

Tämä opinnäytetyö luokitellaan kokeelliseksi tutkimukseksi. Kokeellisessa tutkimuksessa verrataan eri menetelmien tai olosuhteiden vaikutusta käsiteltävään muuttujaan ja niiden vaikutusta toiseen muuttujaan (Karjalainen 2004, 22). Sopivan koejärjestelyn avulla, jossa kaikki muut tekijät on vakioitu eli yhdenmuikaistettu, voidaan osoittaa tutkitun olettamuksen paikkansapitävyys (Karjalainen 2004, 22; Heikkilä 2004, 21). Tässä tutkimuksessa havaintoaineisto kerättiin koejärjestelyn avulla, jossa kahdella eri menetelmällä dekalsifioitiin kovakudosnäytteitä ja värjättiin kolmella eri värjäysmenetelmällä. Huoneenlämmössä dekalsifioidut näytteet toimivat referenssinäytteinä, joihin verrattiin mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioituja näytteitä. Hematoksyliini-eosiini-, Gomori- ja Van Gieson-värjäyksistä arvioitiin solu- ja kudismorfologian värjäytyminen, jotka arvioitiin numeraalisesti asteikolla 0-5. Numeraalisen arvioinnin pohjalta saatiin muuttujat, jotka taulukoitiin ja käytettiin tilastollisen käsittelyn pohjana.

Kvantitatiivisessa ja kvalitatiivisessa tutkimuksessa pilottitutkimusta eli esitutkimusta käytetään esimerkiksi kyselylomakkeen esitestaukseen ennen varsinaista tutkimusta. Esitutkimuksella saadaan hyödyllistä tietoa lomakkeen kysymysten muotoilusta ja sisällöstä. (Heikkilä 2004, 17–18.) Tässä opinnäytetyössä esitestaus suoritettiin kahdella eri kovakudosnäytteellä, joita käsiteltiin mikroaaltouunimenetelmällä. Esitutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka kauan kovakudosnäytteitä käsitellään mikroaaltouunissa.

6.2 Tutkimustulosten tilastollinen käsittely

Tutkimuksessa käytettiin Excel-taulukko-ohjelmaa, jossa havainnot taulukoitiin ja havaintomatriisi käsiteltiin vaadituin tunnusluvin. Havaintomatriisin käsittelyssä käytettiin sijaintilukuun kuuluvaa keskiarvoa ja hajontaluvuista keskihajontaa. Keskiarvo saadaan laskemalla havaintoarvojen summa ja jakamalla se havaintojen lukumäärällä (Heikkilä 2004, 83). Keskihajonta eli standardipoikkeama kuvaa havaintojen ryhmittymistä keskiarvon ympärille, ja sitä laskettaessa otetaan huomioon kaikki muuttujien arvot. Mitä vähemmän havaintoarvot poikkeavat keskiarvosta, sitä pienempi on keskihajonta. (Karjalainen 2004, 84.)

6.3 Näyttemateriaali

Tämän opinnäytetyön tutkimuksellinen osa on tehty Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymän patologian laboratorion toimeksiantona 9.9 – 20.10.2010. Tähän tutkimukseen käytetyt kovakudosnäytteet saatiin avaussalista. Näytteet tulivat kahdessa erässä formaliinia sisältävässä näytepurkeissa. Ensimmäinen erä saapui 1.9.2010, ja siinä olivat selkäranganäyte, kylkiluu- ja solisluunäytteet. Viimeiset tutkimuksessa käytetyt näytteet tulivat 17.9.2010, ja ne olivat kylkiluuta sekä suoliluuta.

Kovakudosnäytteitä tuli kaksi palaa kutakin luunäytettä. Ne mitattiin, numeroitiin ja näytteille annettiin myös koodi A tai B. A-näytteet olivat referenssinäytteitä, joihin verrattiin mikroaaltouunikäsitteltyjä näytteitä eli B-näytteitä. A1 selkäranka, A2 kylkiluu ja A3 solisluu, jotka olivat kooltaan näytepaloista pienimmät, laitettiin dekalsifioitumaan EDTA:han vetokaappiin, jonka lämpötila oli 20 °C. A-näytteet olivat tutkimuksessa referenssinäytteitä, joihin verrattiin mikroaaltouunikäsitteltyjä näytteitä. Dekalsifioitumisen etenemistä eli luun pehmenemistä seurattiin neulatestillä, joka tehtiin aluksi kerran viikossa, koska dekalsifioituminen huoneenlämmössä on hidaskeski prosessi. Dekalsifioitumisen edetessä neulatesti tehtiin useammin, ja saadut tulokset kirjattiin erilliselle seurantalomakkeelle, johon merkittiin myös vetokaappin lämpötila. Dekalsifioitumisen etenemisen seurantalomake on liitteessä 2. Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kun-

tayhtymän patologian laboratoriossa on käytössä huoneenlämmössä tapahtuva kovakudosnäytteiden dekalsifointimenetelmä, jossa dekalsifointiliuoksena käytetään EDTA:ta.

6.4 Esitutkimus

Tässä opinnäytetyössä esitutkimus tehtiin näytteillä B1 ja B2. Esitutkimuksen tulosten pohjalta arvioitiin dekalsifointiin kuluva aikaa mikroaaltouunissa. Esitutkimus suunniteltiin ja toteutettiin ensimmäisen näyte-erän saavuttua. Esitutkimuksen pohjana käytettiin, mikroaaltouunikäsittelyaikojen osalta, vuonna 2003 patologian laboratoriossa tehtyä luun dekalsifointia EDTA-liuoksessa mikroaaltouunilla. Kovakudosnäytteitä käsiteltiin 4x60 minuuttia mikroaaltouunissa, jonka jälkeen näytteitä säilytettiin EDTA:ssa huoneenlämmössä viikonlopun yli ja laitettiin käyntiinpanoon seuraavana arkipäivänä. Näytteet leikkautuivat hyvin ja mikroskooppisessa tarkastelussa havaittiin solujen säilyneen hyvin.

Näytteet B1 ja B2 kasetoitiin Tissue-Tek mega-kasetti 125:n. Näytteet käsiteltiin mikroaaltouunissa ohjelmalla 50 °C S30 M LM 700 ml, johon ohjelmoitiin aloitusajaksi 120 minuuttia. Neulatestit tehtiin B1- ja B2-näytteille noin 1-2 tunnin välein ja mikroaaltouunikäsittelyaikaa jatkettiin neulatestin perusteella. Mikroaaltouunikäsittelyn loppuvaiheessa näytteet lohkottiin kolmeen osaan dekalsifointin nopeuttamiseksi. Näytteiden kokonaiskäsittelyaika mikroaaltouunissa oli 7 tuntia 50 minuuttia.

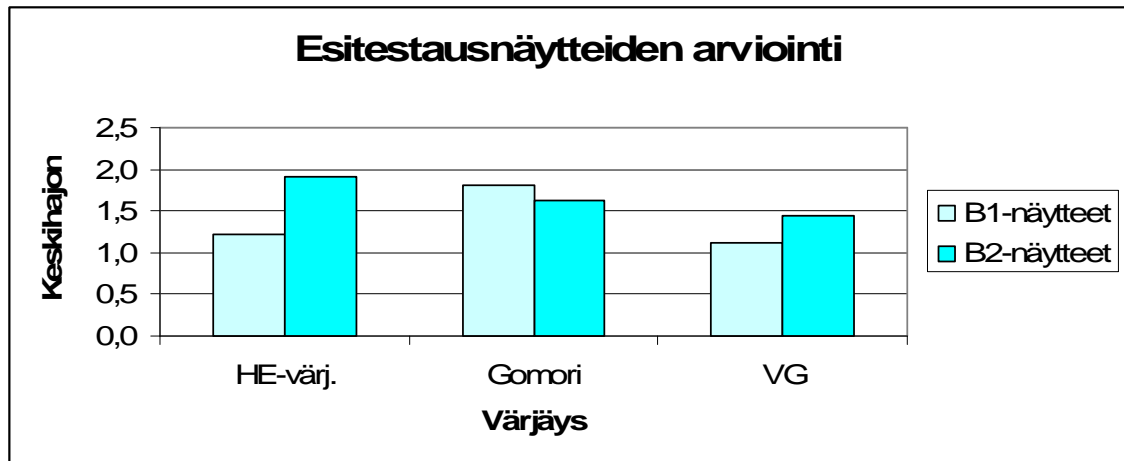
Näytteestä B1 pystyttiin arvioimaan hematoksyliini-eosiini-, Gomori- ja Van Gieson-värjäyksen osalta kudoksen ja solumorfologia. Gomori-värjäyksessä yksittäisten solujen ja tumien erottuminen ei onnistunut. Näytteessä B2 kylkiluu oli rustoa, lihas- ja sidekudosta. Näytteestä arvioitiin hematoksyliini-eosiini- eli HE-värjäyksen osalta vain side- ja lihaskudos sekä kudosten morfologian säilymisen osalta tumien rakenne. Gomori-värjäyksessä pystyttiin arvioimaan side- ja lihaskudoksen värjäytyminen sekä rustosta kudosten morfologian säilyminen. Van Gieson- eli VG-värjäyksessä arvioitiin ruston sekä side- ja lihaskudoksen värjäytymistä sekä rustosta kudosten morfologian säilyminen. B2-näytteestä luuta ei löy-

tynyt tai sen osuus on ollut niin pieni, että se oli dekalsifioitumisen aikana liuen-
nut kokonaan pois. Näytteitä B1 ja B2 säilytettiin 10.9–13.9.10 EDTA:ssa, jossa
dekalsifioituminen jatkui 4 vuorokautta. Taulukossa 2 ovat esitestausnäytteiden
mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioitujen näytteiden käsittelyajat. Taulukossa
on merkinnät: dekalsifioitumisen aloitusajankohta (dek.al), lopettamisajankohta
(dek.lop), mikroaaltouunissa käsittelyaika minuutteina (min) ja mikroaaltouunis-
sa käsittelyaika tunteina ja minuutteina (tuntia/min).

Taulukko 2. Esitestausnäytteiden käsittelyajat

Näyte	koko/mm	dek.al	dek.lop	°C	min	tuntia/min
B1 selkäranka	2 x 1.4 x 0.5	10.9.10	13.9.10	50	470	7.50min
B2 kylkiluu	2.2 x 1.5 x 0.9	10.9.10	13.9.10	50	470	7.50min

Esitutkimusnäytteistä leikattiin näytteet kahdeksalle objektilasille. Näytteistä B1
ja B2 tehtiin leikkeet neljälle lasille, joista kaksi oli pluslaseja. Kaksi kappaletta
tavallisista leikelaseista värjättiin värjäysautomaatissa hematoksyliini-
eosiinivärjäyksellä, ja kahdesta plussalaseleikkeistä tehtiin Van Gieson- ja Go-
mori-värjäykset käsin. Leikkeiden värjäytymistä arvioi patologi, joka antoi näyt-
teen eri osien värjäytymiselle arvosanan 0-5. Arvioinnissa nolla tarkoittaa nega-
tiivinen tai epäonnistunut ja arvosana viisi erinomainen värjäys (liite 3). Leikkeis-
tä arvioitiin luukudoksen, luuytimen sekä side- ja lihaskudoksen värjäytymistä.
Kudosmorfologian säilymistä arvioitiin luu- ja pehmytkudosten yksittäisten solu-
jen sekä tuman rakenteen erottumisella. Tuman rakenteessa on otettu huomi-
oon tuman eri osien erottuminen, esimerkiksi ribosomit ja nukleolit. Kuviossa 1
on esitestausnäytteiden keskihajonta. Keskihajonta kuvaa, kuinka kaukana
muuttujan arvot ovat keskiarvosta.



Kuvio 1. Esitestausnäytteiden keskihajonta erivärjäysten osalta

Esitutkimuksessa saatujen tietojen pohjalta varsinaisessa tutkimuksessa mikroaaltouunikäsittelyyn menevien näytteiden aloitusajaksi asetettiin 3 tuntia, jonka jälkeen näytteille tehtiin luun pehmenemisen seuraamiseksi neulatesti.

6.5 Työn toteutus

Mikroaaltouunissa tapahtuvaa dekalsifioitumista varten kovakudosnäytteistä kooltaan suurimmat merkittiin B3 solisluu, B4 I kylkiluu, B4 II kylkiluu, B5 I suoliluu ja B5 II suoliluu. Näytteet B4 I-II ja B5 I-II saapuivat kahdeksan vuorokautta ensimmäisen näyte-erän jälkeen. Niitä fiksoitiin formaliinissa vielä kolme vuorokautta, minkä vuoksi päädyttiin pelkästään näytteiden käsittelyyn mikroaaltouunimenetelmällä. Kovakudosnäytteitä fiksoidaan 2-4 vuorokautta formaliinissa ennen dekalsifioinnin aloittamista (Callis 2008, 337). Histologisista näytteistä kovakudosnäytteet vaativat pisimmän fiksaatioajan kudoksen kovuuden ja sitkeyden vuoksi. Histologisten näytteiden fiksaatioaika riippuu kudoksen koosta sekä laadusta, ja fiksaation tarkoituksena on pysäyttää kudoksen autolyysi. Tässä tutkimuksessa kovakudosnäytteitä fiksoitiin 2-3 vuorokautta. Taulukossa 3 ovat näytteiden tunnistuskoodi sekä erittely dekalsifointimenetelmästä.

Taulukko 3. Näytteiden tunnistuskoodi sekä näytteiden dekalsifointimenetelmä

Näytteiden tunnistuskoodi	Dekalsifointi huoneenlämmössä	Dekalsifointi mikroaaltouunimenetelmällä
A1 selkäranka	x	
A2 kylkiluu	x	
A3 solisluu	x	
B3 solisluu		x
B4 I kylkiluu		x
B4 II kylkiluu		x
B5 I suoliluu		x
B5 II suoliluu		x

Tässä tutkimuksessa käytetty Mikromed T/T mega-mikroaaltouuni on tarkoitettu histologisten näytteiden käsittelyyn. Laitteisto ja sen tarvikkeet on suunniteltu laboratoriokäyttöön, esimerkiksi dekalsifointiin ja fiksaatioon. Laitteen ominaisuuksiin kuuluvat infrapunalämmön mittausta, magneettisekoittaja sekä eri ohjelmien ajastusmahdollisuus. Dekalsifointiin käytetyssä ohjelmassa S30 M tarkoittaa histomodulin tyyppiä, johon voidaan käyttää enimmillään 1200 ml dekalsifointiliuosta. (Micromed T/T 2001.) Tutkimuksessa käytettiin ohjelmaa 50 °C S30 M 700 ml, johon voitiin manuaalisesti säätää haluttu dekalsifoitumisaika. Ohjelma oli tarkoitettu kooltaan pienille näytteille.

B-näytteet kasetoitiin Tissue-Tek mega-kasetti 125 joka oli kooltaan suurin näytekasetti. Käyttämällä suurinta näytekasettia varmistettiin EDTA-liuoksen mahdollisimman hyvä kosketus näytteeseen. Näytteet laitettiin kannelliseen lasiastiaan eli histomodulin pohjalle pystyasentoon sekä 700 ml EDTA-liuosta. Näyte B3 lohkottiin kahteen osaan dekalsifoinnin edetessä, mutta näytteet B4 I, II, B5 I ja II olivat kooltaan sen verran pieniä, ettei niitä ryhdytty lohkomaan pienempiin osiin. Näytteitä säilytettiin EDTA:ssa mikroaaltouunikäsittelyn väliajat, sillä tutkimus ajoittui useammalle päivälle. Näytteiden dekalsifoitumisastetta seurattiin neulatestein ennen ja jälkeen mikroaaltouunikäsittelyä.

Huoneenlämmössä tapahtuvaa dekalsifioimista varten näytepaloista pienimmät A1 selkäranka, A2 kylkiluu ja A3 solisluu laitettiin EDTA:han 20 °C:n lämpötilaan vetokaappiin. Dekalsifoitumisastetta seurattiin viikoittaisilla neulatesteillä ja dekalsifioitumisen edetessä useammin (liite 4). Näytteiden käsittelystä pidet-

tiin laboratoriopäiväkirjaa, johon kirjattiin ylös dekalsifioitumisen aloitus- ja lopetusajankohdat sekä dekalsifioitumisen seuranta neulatestein. Dekalsifioinnin valmistuttua A- sekä B-näytteet laitettiin pienempiin näytekasetteihin ja säilytettiin ennen kuduskuljetukseen siirtoa 10-prosenttisessa formaliiniliuoksessa. Näytteet kävivät läpi kuduskuljetusprosessin, jonka jälkeen ne valettiin parafiiniblokeiksi.

Kovakudosnäytteet pysyvät huonosti päivittäisessä käytössä olevan objektilasin pinnalla ja voivat mennä värjäysvaiheessa kasaan tai siirtyä kokonaan pois objektilasin pinnasta. Parafiiniblokeista tehtiin mikrotomilla leikkeitä neljälle eri objektilasille, joista kaksi oli tavallista objektilasia ja kaksia pluslaseja. Pluslasien pinta on käsitelty siten, että niissä on pysyvä positiivinen varaus ja sen vuoksi leikkeet pysyvät lasilla paremmin. Tavalliset objektilasit, 2 kappaletta, laitettiin hematoksyliini-eosiinivärjäykseen värjäysautomaattiin. Pluslaseista tehtiin Gomori- ja Van Gieson-värjäykset, jotka suoritettiin käsin. Värjäykset A- ja B-näytteille teki kokenut bioanalytikko, joka oli erikoistunut käsin tehtävien värjäysten tekoon. Värjättyjen A- ja B-näytteiden mikroskooppisen arvioinnin suoritti patologi, joka arvioi näytteistä solu- ja kudismorfologisen värjäytymisen. Kudosnäytteen mikroskooppisessa tutkimuksessa on tarkoitus saada käsitys histologisen näytteen yleisrakenteesta eli morfologiasta (Naukkari 2000, 153–154). Värjäämätön näyte ei erotu valomikroskoopissa vaan, kudosnäyte on värjättävä väriaineilla, jotka absorboivat valoa. Kudosten värjäyksissä käytetään histokemiallisia värjäysmenetelmiä, jotka perustuvat tunnettuihin kemiallisiin reaktioihin. Värjäyksen avulla kudosnäytteen soluista voidaan erottaa solukalvo ja solulima sekä tuma ja muita soluorganelleja (Kylmäoja 2009; Lehtonen 2011, 6-11).

7 TUTKIMUSTULOKSET

7.1 Huoneenlämmössä dekalsifoidut näytteet

Tutkimuksessa referenssinäytteinä olivat huoneenlämmössä EDTA-liuoksessa dekalsifoidut A1-3-näytteet, joihin verrattiin mikroaaltouunilla käsiteltyjä B3-, B4

I-, II- ja B5 I-, II-näytteitä. A-näytteistä leikattiin yhteensä 12 lasia. Laseista 6 kappaletta värjättiin hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä värjäysautomaatissa, 3 kappaletta Van Gieson- ja 3 kappaletta Gomori-erikoisvärjäyksillä. Leikkeiden värjäytymistä arvioi patologi, joka antoi näytteen eri osien värjäytymiselle arvosanan 0-5. Arvioinnissa nolla tarkoittaa negatiivinen tai epäonnistunut ja arvosana viisi erinomainen värjäys. Leikkeistä arvioitiin luukudoksen, luuytimen, side- ja lihaskudoksen värjäytymistä. Kudosmorfologian säilymistä arvioitiin luu- ja pehmytkudosten yksittäisten solujen sekä tuman rakenteen erottumisella. Tuman rakenteessa on otettu huomioon tuman eri osien erottuminen, esimerkiksi ribosomit ja nukleolit. Liitteessä 3 on leikkeiden arviointiin käytetty lomake, jossa ovat arviointikriteerit sekä arvioinnin toteutus A- ja B-näytteille. Kaikista näytteistä tehtiin hematoksyliini-eosiini-, Gomori- ja Van Gieson-värjäykset.

Huoneenlämmössä käsiteltujen A-näytteiden dekalsifioitumisajat vaihtelivat 25–34 vuorokautta. Taulukossa 4 on eriteltynä huoneenlämmössä dekalsifioitujen näytteiden koko, dekalsifioitumisen aloitusajankohta (dek.al), dekalsifioitumisen lopettamisajankohta (dek.lop). Kulunut aika ilmaistaan täysinä vuorokausina ja viimeisessä sarakkeessa kokonaisina viikkoina ja päivinä. Huoneenlämmössä dekalsifioitujen A-näytteiden dekalsifioinnin toteutus on liitteessä 4.

Taulukko 4. Huoneenlämmössä dekalsifioitujen näytteiden käsittelyajat

Näyte	koko	dek.al	dek.lop	°C	vrk	vko/päivää
A1 selkäranka	1.5-2x1.2x1	9.9.10	5.10.10	20	27	3/6
A2 kylkiluu	2 x 1.5 x 0.6	9.9.10	12.10.10	20	34	4/6
A3 solisluu	2.2 x 2.5 x 0.4	13.9.10	7.10.10	20	25	3/4

Näytteen eri osien värjäytymiselle annettiin arvosana 0-5. Arvioinnissa nolla tarkoittaa negatiivinen tai epäonnistunut ja arvosana viisi erinomainen värjäys (liite 3). Taulukossa 5 näkyvät patologin antamat arvosanat näytteille A1, A2 ja A3. Leikkeistä arvioitiin luukudoksen, luuytimen, side- ja lihaskudoksen yksittäisten solujen värjäytymistä sekä solumorfologian osalta tumanrakenteen eriosien erottumisella. Arvosanoja kullekin näytteelle annettiin kokonaisuudessaan 21 kappaletta. Patologi arvioi yhden lasin kutakin värjäystä eli A1-, A2- ja

A3-näytteistä kolme eri värjäystä, yhteensä 9 näytelasia. Näyte A1 sai arvion 0 (negatiivinen, epäonnistunut) 3 kappaletta, arvion 1 (niukasti värjäytynyt) ei yhtään kappaletta, arvion 2 (heikosti värjäytynyt) 1 kappaleen, arvion 3 (hyvä, ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta) 1 kappaleen, arvion 4 (lähes moitteeton, lievää ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta) 6 kappaletta ja arvion 5 (erinomainen) 10 kappaletta. A2-näytteelle annetut arvosanat olivat 3 -5, mutta A3-näytteen arvosanat vaihtelivat 0-5.

Taulukko 5. Arvosanat 0-5 huoneenlämmössä dekalsifoiduille A-näytteille

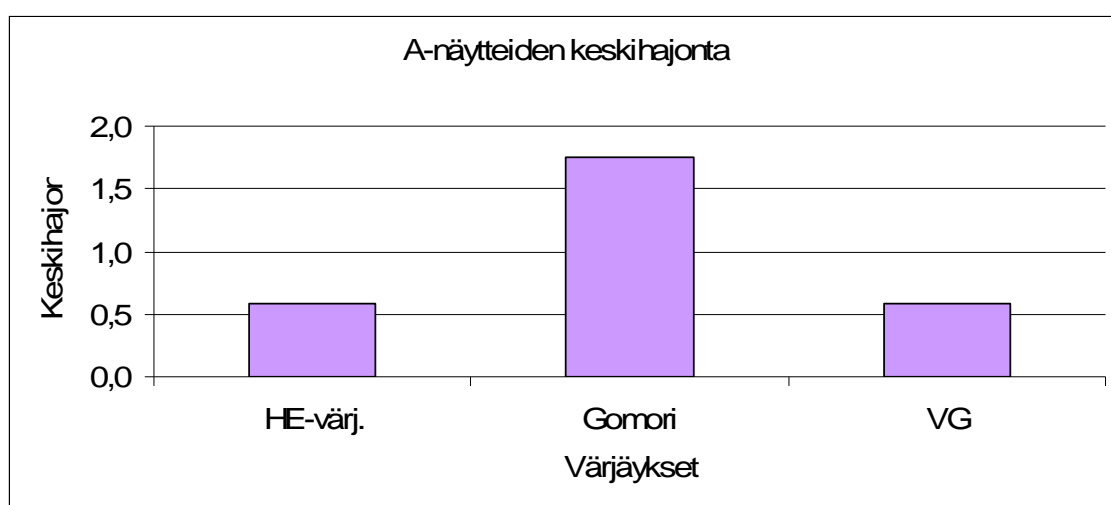
	0	1	2	3	4	5	Kpl
A1	3		1	1	6	10	21
A2	1			3	6	11	21
A3	1		1	2	7	10	21

Taulukossa 6 ovat A-näytteiden arvosanojen perusteella lasketut näytekohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta. Tuloksiin on sisällytetty kudosisäilytys- sekä solumorfologiset arviot. Taulukossa 6 A1-näytteen hematoksyliini-eosiinivärjäyksen keskiarvo on 4,4, A2-näytteen keskiarvo 4,7 ja A3-näytteen keskiarvo on 4,9. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksen värjäyskohtainen keskiarvo (värj.ka.) 4,7 on laskettu A1-A3-näytteiden keskiarvoista. Gomori-värjäyksessä A1-näytteen keskiarvo on 2, A2-näytteen keskiarvo 3,3 ja A3-näytteen keskiarvo on 2,8. Gomori-värjäyksen värjäyskohtainen keskiarvo (värj.ka.) 2,8 on laskettu A1-A3-näytteiden keskiarvoista. Näytteen A1 Van Gieson-värjäyksen keskiarvo 4,9, A2-näytteen keskiarvo 4,6 ja A3-näytteen keskiarvo 4,4. Van Gieson värjäyksen värjäyskohtainen keskiarvo (värj.ka.) 4,6 on laskettu A1-A3-näytteiden keskiarvoista.

Taulukko 6. A-näytteiden keskiarvot ja värjäyskohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta

Värjäys	A1	A2	A3	Värj. ka.	Keskihajonta
Hematoksyliini-eosiini	4,4	4,7	4,9	4,7	0,6
Gomori	2	3,3	3	2,8	1,8
Van Gieson	4,9	4,6	4,4	4,6	0,6

Kuviossa 3 on A-näytteiden keskiarvosta laskettu keskihajonta. Keskihajonnalla tarkastellaan näytteille annettujen numeraalisten arvosanojen hajontaa, joka antaa keskiarvoa havainnollistavamman tuloksen. Mitä suurempi on hajontaluku, sitä enemmän muuttujien arvosanoissa on hajontaa, mutta pienempi hajonta-arvo asettaa arvosanat lähelle toisiaan eli arvosanoissa on hajontaa vähemmän. Kuviossa 2 matala pylväs osoittaa, että hematoksyliini-eosiini- (HE-värj.)- ja Van Gieson- (VG)-värjäyksessä keskihajonta oli pieni ja värjäykset ovat olleet toistettavia.



Kuvio 2. A-näytteiden keskihajonta

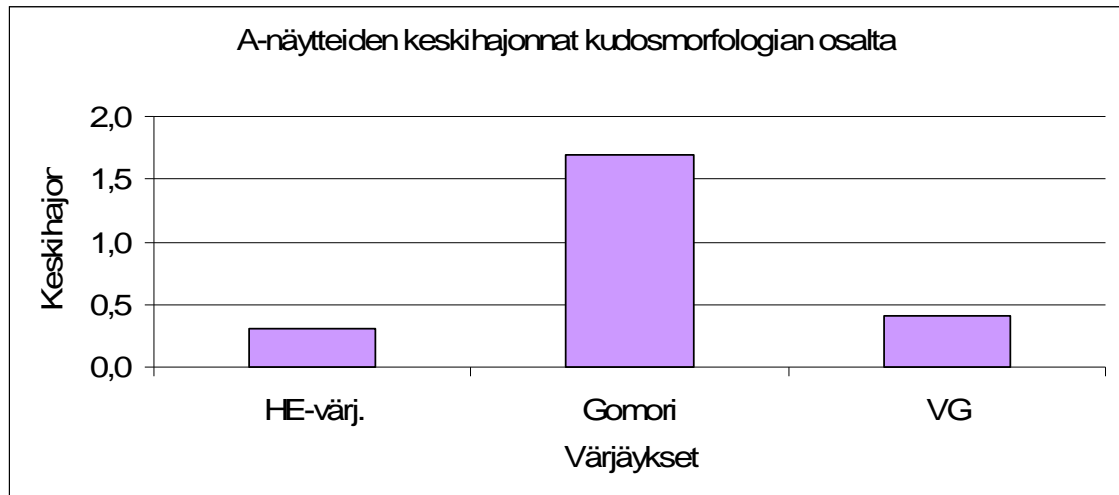
Taulukossa 7 ovat A-näytteille kudosis- ja solumorfologian osalta annettujen arvosanojen perusteella lasketut näytekohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta.

Taulukossa on myös värjäyskohtainen keskiarvo (värj.ka), joka on laskettu näytteiden keskiarvosta.

Taulukko 7. A-näytteiden keskiarvot, värjäyskohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta kudosis- sekä solumorfologian osalta

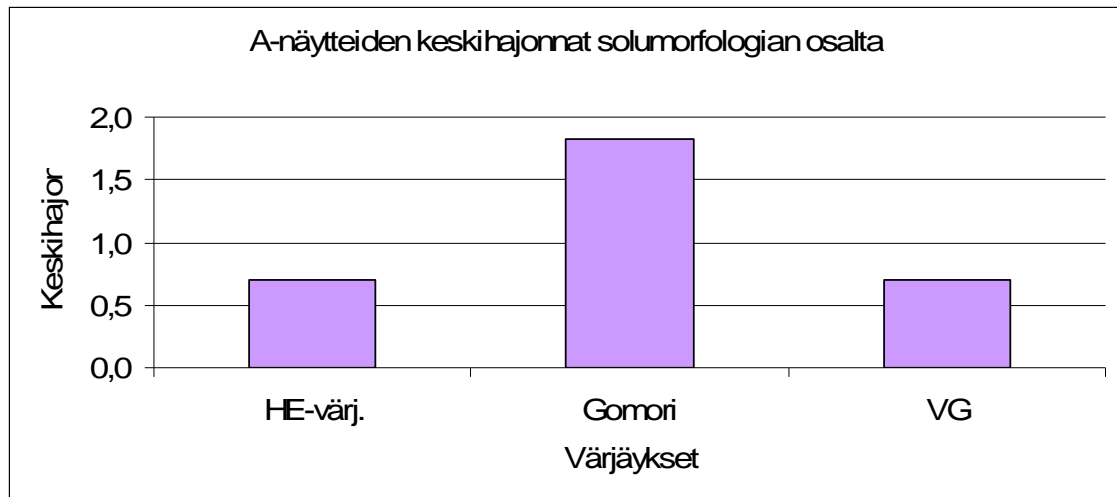
	Värjäys	A1	A2	A3	Värj. ka.	Keskihajonta
Kudosis	He	5	5	4,7	4,9	0,3
	Gomori	4	2,3	2,7	3	1,7
	VG	5	4,7	4,7	4,8	0,4
Solumorfologia	He	4	4,5	5	4,5	0,7
	Gomori	0,5	4	3,3	2,6	1,8
	VG	4,8	4,5	4,3	4,5	0,7

Leikkeistä arvioitiin luukudoksen, luuytimen sekä side- ja lihaskudoksen morfologian värjäytymistä. Kuviossa 3 on A-näytteiden kudismorfologian osalta keskiarvosta laskettu keskihajonta. Hematoksyliini-eosiini- (HE)- ja Van Gieson- (VG)-värjäysten keskihajonta kudismorfologian osalta oli alle 0,5.



Kuvio 3. A-näytteiden kudismorfologian arviointi

Leikkeistä arvioitiin yksittäisten solujen värjäytymistä sekä tuman rakenteen erottumista. Tuman rakenteessa on otettu huomioon tuman eri osien erottuminen, esimerkiksi ribosomit ja nukleolit. Kuviossa 4 on A-näytteiden solumorfologian osalta keskiarvosta laskettu keskihajonta. Hematoksyliini-eosiini- (HE)- ja Van Gieson- (VG)-värjäysten keskihajonta solumorfologian osalta oli 0.7.



Kuvio 4. A-näytteiden solumorfologian arviointi

7.2 Mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioidut näytteet

Mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioitujen B-näytteiden dekalsifioitumiseen kului näytteestä riippuen noin 6-30 tuntia. Taulukossa 8 on eriteltynä mikroaaltouunissa dekalsifioitujen näytteiden koko, dekalsifioitumisen aloitusajankohta (dek.al) ja lopettamisajankohta (dek.lop) sekä mikroaaltouunissa käsittelyaika minuutteina (min) ja viimeisessä sarakkeessa mikroaaltouunissa käsittelyaika tunteina ja minuutteina.

Taulukko 8. Mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioitujen näytteiden käsittelyajat

Näyte	koko/mm	dek.al	dek.lop	°C	min	tuntia/min
B3 solisluu	2.5 x 2.5 x 0.7	13.9.10	5.10.10	50	1830	30.30min
B4 I kylkiluu	1.1 x 0.4 x 0.2	20.9.10	23.10.10	50	390	6.30min
B4 II kylkiluu	1.0 x 0.7 x 0.1	20.9.10	23.10.10	50	390	6.30min
B5 I suoliluu	1.3 x 0.7 x 0.7	20.9.10	5.10.10	50	1650	27.30min
B5 II suoliluu	1.2 x 0.9 x 0.4	20.9.10	5.10.10	50	1530	25.30min

Taulukossa 9 näkyvät patologin antamat arvosanat näytteille B3, B4 I, B4II, B5 I ja B5 II. Leikkeistä arvioitiin luukudoksen, luuytimen sekä side- ja lihaskudoksen yksittäisten solujen värjäytymistä sekä solumorfologian osalta tuman rakenteen erottumista (ks. liite 3). Arvosanoja kullekin näytteelle annettiin kokonaisuudessaan 21 kappaletta. B-näytteistä leikattiin yhteensä 20 lasia, joista 10 kappaletta

värjättiin hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä värjäysautomaatissa, 5 kappaletta Van Gieson- ja 5 kappaletta Gomorierikoisvärjäyksillä. Patologi arvioi yhden lasin kutakin värjäystä eli B3-, B4 I-, B4 II-, B5 I- ja B5 II-näytteistä kolme eri värjäystä, yhteensä 15 näytelasia. Näyte B3 sai arvion 0 (negatiivinen, epäonnistunut) 1 kappaleen, arvion 1 (niukasti värjäytynyt) ei yhtään kappaletta, arvion 2 (heikosti värjäytynyt) 2 kappaletta, arvion 3 (hyvä, ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta) 1 kappaleen, arvion 4 (lähes moitteeton, lievää ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta) 12 kappaletta ja arvion 5 (erinomainen) 5 kappaletta. B4 I-, B4 II- ja B5 I-näytteiden arvosanat vaihtelivat 3-5:n välillä ja B5 II näytteen arvosanat vaihtelivat 2-5: n välillä.

Taulukko 9. Mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifioitujen B-näytteiden arvosanat

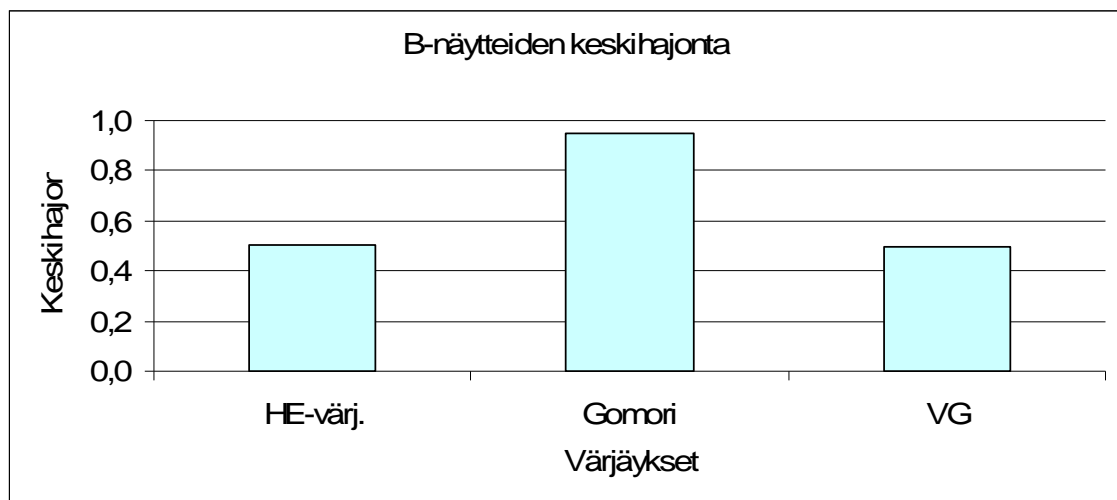
	0	1	2	3	4	5	Kpl
B3	1		2	1	12	5	21
B4 I				6	12	3	21
B4 II				2	16	3	21
B5 I				4	6	11	21
B5 II			1	5	11	4	21

Taulukossa 10 ovat B-näytteiden arvosanojen perusteella lasketut näytekohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta. Tuloksiin on sisällytetty kudos- sekä solumorfologiset arviot. Taulukossa on myös värjäyskohtainen keskiarvo, joka on sarakkeessa värj.ka. Värjäyskohtainen keskiarvo (värj.ka) on laskettu näytteiden keskiarvosta.

Taulukko10. B-näytteiden keskiarvot ja värjäyskohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta

Värjäykset	B3	B4 I	B4 II	B5 I	B5 II	Värj.ka.	Keskihajonta
Hematoksyliini-eosiini	4,7	4,4	4,4	4,7	4,4	4,5	0,5
Gomori	2,9	3,4	3,7	3,9	3,3	3,4	0,9
Van Gieson	3,9	3,7	4	4,4	3,9	4,0	0,5

Kuviossa 5 on B-näytteiden keskiarvosta laskettu keskihajonta. Keskihajonta kuvaa näytteiden annettujen numeraalisten arvosanojen hajontaa. Mitä suurempi hajontaluku on, sitä enemmän muuttujien arvosanoissa on hajontaa, mutta pienempi hajonta-arvo asettaa arvosanat lähelle toisiaan eli arvosanoissa on hajontaa vähemmän. Kuviossa 5 matala pylväs osoittaa, että hematoksyliini-eosiini- ja Van Gieson-värjäyksissä keskihajonta on molemmissa yhtä pieni (0,5) ja värjäykset ovat olleet toistettavia.



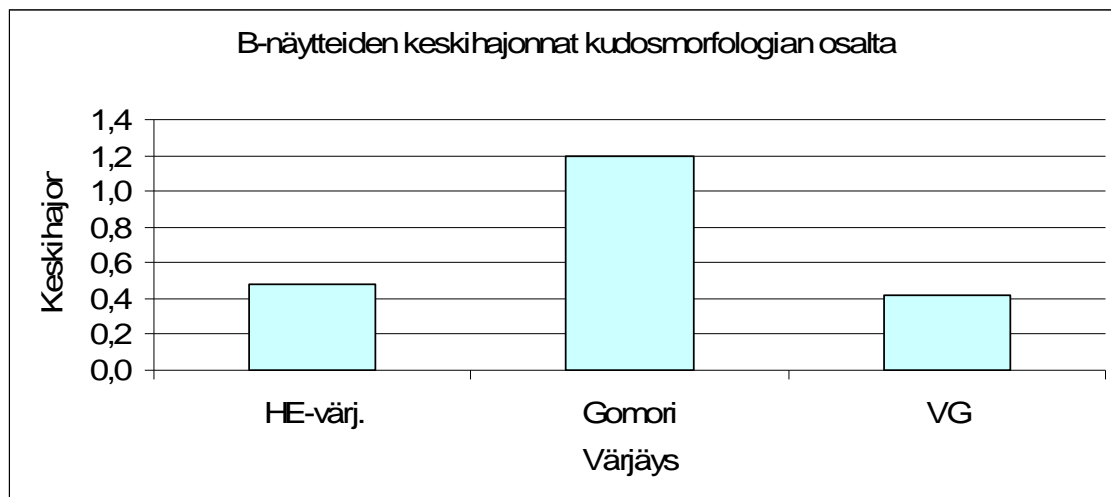
Kuvio 5. B-näytteiden keskihajonta

Taulukossa 11 ovat B-näytteiden arvosanojen perusteella lasketut näytekohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta eriteltynä kudosis- sekä solumorfologian osalta. Taulukossa on myös värjäyskohtainen keskiarvo (värj.ka), joka on laskettu näytteiden keskiarvosta.

Taulukko 11. B-näytteiden keskiarvot, värjäyskohtaiset keskiarvot sekä keskihajonta kudosis- sekä solumorfologian osalta

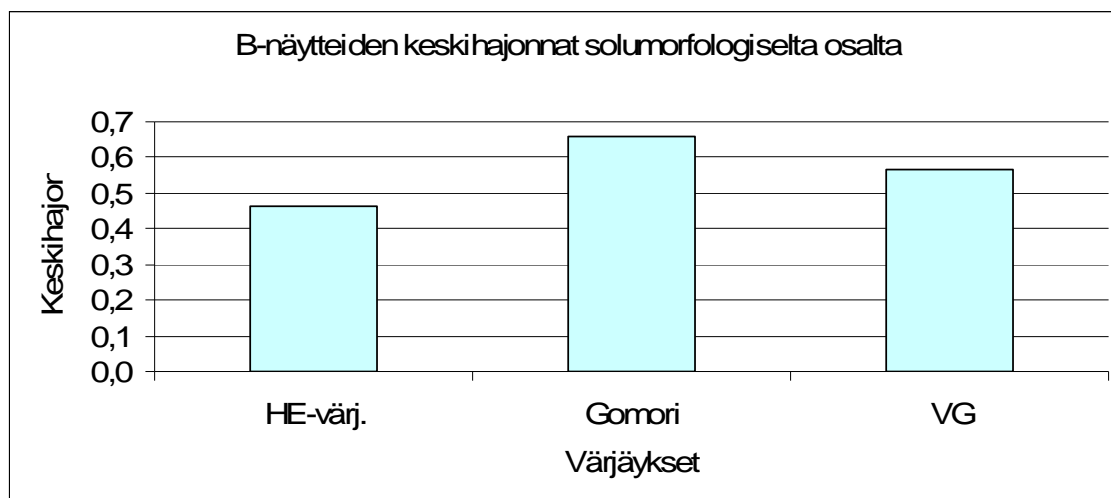
		B3	B4I	B4II	B5I	B5 II	Värj.ka.	Keskihajonta
Kudosis morfologia	He	4,3	4,3	4,3	5	4,3	4,4	0,5
	Gomori	2,7	3,3	4	4,7	3,7	3,7	1,2
	VG	4	4	4	5	4	4,2	0,4
Solumorfologia	He	5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,6	0,5
	Gomori	3	3,5	3,5	3,3	3	3,3	0,7
	VG	3,8	3,5	4	4	3,8	3,8	0,6

Leikkeistä arvioitiin luukudoksen, luuytimen sekä side- ja lihaskudoksen morfologian värjäytymistä. Kuviossa 6 on B-näytteiden kudismorfologian osalta keskiarvosta laskettu keskihajonta. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä kudismorfologian osalta keskihajonta oli 0,5 ja Van Gieson-värjäyksen 0,4.



Kuvio 6. B-näytteiden kudismorfologian arviointi

Leikkeistä arvioitiin yksittäisten solujen värjäytymistä sekä tuman rakenteen erottumista. Tuman rakenteessa on otettu huomioon tuman eri osien erottuminen, esimerkiksi ribosomit ja nukleolit. Kuviossa 7 on B-näytteiden solumorfologian osalta keskiarvosta laskettu keskihajonta. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä solumorfologian osalta keskihajonta oli 0,5 ja Van Gieson-värjäyksessä 0,6.



Kuvio 7. B-näytteiden solumorfologian arviointi

Mikrotomilla leikkaamisen suoritti kokenut bioanalyytikko, joka samalla arvioi näytteiden leikkautuvuutta. Huomattavia eroja leikkautuvuudessa ei tullut esille, ainoastaan muutama näytekohtainen huomio. Liitteessä 5 on leikkaajan arviointia A- ja B-näytteiden leikkautuvuudesta.

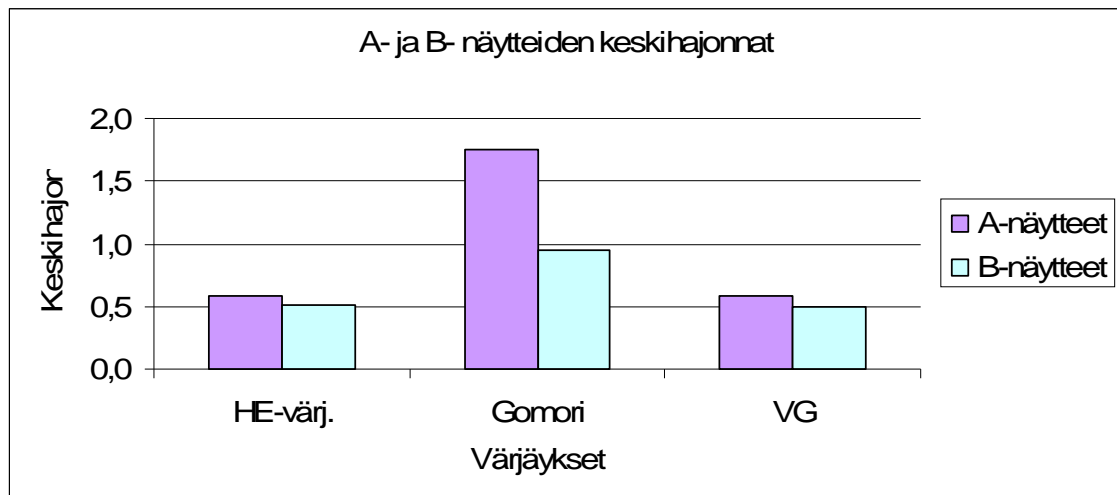
8 POHDINTA

8.1 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksessa käytetyt referenssinäytteet olivat huoneenlämmössä EDTA-liuoksessa dekalsifiodut A1-, A2- ja A3-näytteet, joihin verrattiin mikroaaltouunilla käsiteltyjä B3-, B4 I-, B4 II-, B5 I- ja B5 II-näytteitä. Leikkeistä arvioitiin kudsmorfologian eli luukudoksen, luuytimen sekä side- ja lihaskudoksen värjäytymistä sekä yksittäisten solujen erottumista. Solumorfologiasta arvioitiin tuman eri osien erottuminen, esimerkiksi ribosomit ja nukleolit.

Referenssi A-näytteiden keskiarvo hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä oli 4,7 ja keskihajonta 0,6 (taulukko 6). Vertailu- eli B-näytteissä värjäyksen keskiarvo oli 4,5 ja keskihajonta 0,5 (taulukko 10). B-näytteiden keskihajonta 0,5 osoittaa, että B-ryhmän havaintoarvot ovat lähellä toisiaan eli havaintoarvoissa on vähän hajontaa. Myös A-ryhmän näytteiden hajonta 0,6 on pieni. A-näytteille annetut arviointit keskittyvät arvosanan 5 (erinomainen) ympärille, mutta saivat myös arvosanan 3 (hyvä, ali- tai ylivärjäytymistä, vähäistä epätasaisuutta) kolme kertaa. B-näytteille annetut arvosanat keskittyvät arvosanan 5 (erinomainen) sekä 4 (lähes moitteeton, lievää ali- tai ylivärjäytymistä, vähäistä epätasaisuutta) ympärille, mutta saivat yhden arvosanan 3 (hyvä, ali- tai ylivärjäytymistä, vähäistä epätasaisuutta). Tuloksista voi päätellä että hematoksyliini-eosiinivärjäys onnistu hieman paremmin B-ryhmän näytteillä eli värjäys oli laadultaan tasaisempi.

Kuviossa 8 on A- ja B-näytteiden keskihajontojen vertailu. Mitä suurempi hajontaluku on, sitä enemmän muuttujien arvosanoissa on hajontaa, mutta pienempi hajonta-arvo asettaa arvosanat lähelle toisiaan eli arvosanoissa on hajontaa vähemmän. Kuvioissa matalampi pylväs ilmaisee värjäysten olevan tasalaatuisempia.



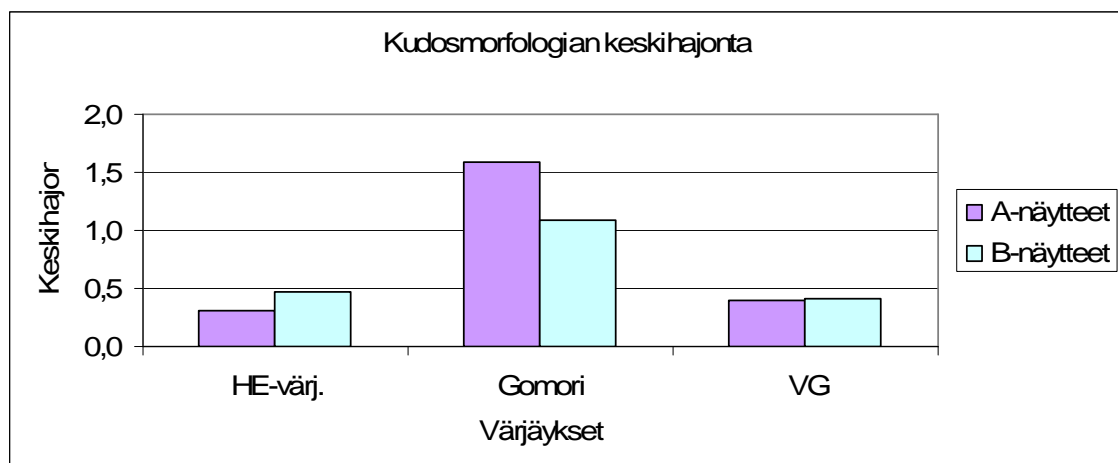
Kuvio 8. A- ja B- näytteiden keskihajontojen vertailu

Gomori-värjäyksessä A-näytteiden värjäyksen keskiarvo oli 2,8 ja keskihajonta 1,8 (taulukko 6). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo oli 3,4 ja keskihajonta 0,9 (taulukko 10). B-ryhmän muuttujien keskiarvo on isompi ja keskihajonta on pienempi eli muuttujissa on vähemmän hajontaa kuin A-ryhmän arvoissa. Tulosten perusteella Gomori-värjäys on onnistunut paremmin B-ryhmän näytteillä.

Van Gieson-värjäyksessä A-näytteiden värjäyksen keskiarvo oli 4,6 ja keskihajonta 0,6 (taulukko 6). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo 4 ja keskihajonta 0,5 (taulukko 10). A-näytteille annetut arvioinnit keskittyvät arvosanan 5 (erinomainen) ympärille sekä 4 (lähes moitteeton, lievää ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta), mutta saivat myös arvosanan 3 (hyvä, ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta) yhdenkerran. B-näytteille annetut arvosanat keskittyvät arvosanan 4 (lähes moitteeton, lievää ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta) ympärille sekä saivat lähes yhtä monta arvosanaa 3 (hyvä, ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta) ja 5 (erinomainen). A- ja

B-ryhmän muuttujien keskihajonta on pientä eli havaintoarvot keskittyvät lähelle toisiaan. Tulosten perusteella Van Gieson-värjäys on onnistunut hieman paremmin B-ryhmän näytteillä eli A-ryhmän värjäysten laatu on vaihdellut enemmän kuin B-ryhmän näytteissä.

Kudosmorfologian osalta hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä, A-näytteiden keskiarvo on 4,9 ja keskihajonta 0,3 (taulukko 7). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo on 4,4 ja keskihajonta 0,5 (taulukko 9). A-ryhmän muuttujien keskihajonta on isompi ja keskihajonta on pienempi kuin B-ryhmän muuttujilla. Tulosten perusteella kudosmorfologinen värjäytyminen onnistui paremmin A-ryhmän näytteillä. Kuviossa 9 on A- ja B-näytteiden keskihajontojen vertailu kudosmorfologian osalta. Keskihajontojen vertailussa matalampi pylväs edustaa parempaa tulosta.

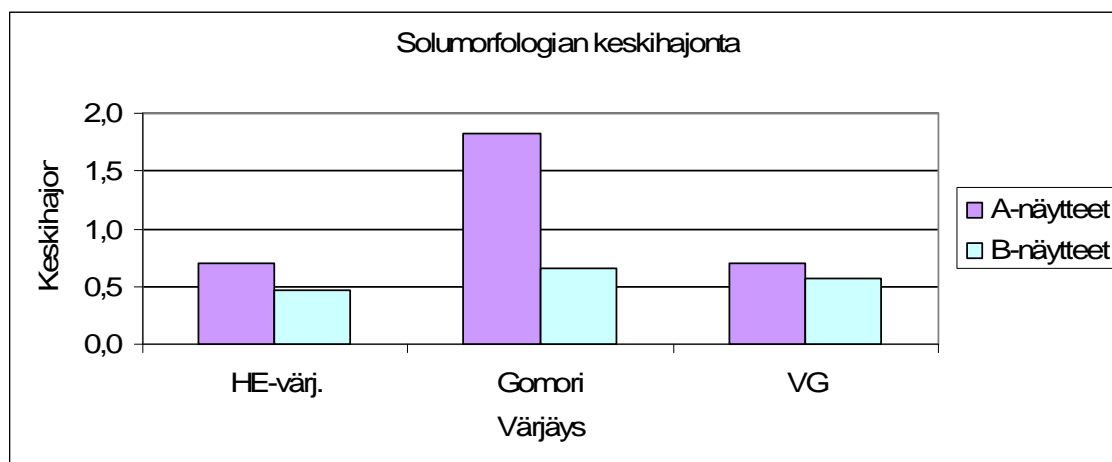


Kuvio 9. A- ja B- näytteiden kudosmorfologinen keskihajontojen vertailu

Gomori-värjättyjen A-näytteiden kudosmorfologian värjäytymisen keskiarvo oli 3 ja keskihajonta 1,7 (taulukko 7). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo oli 3,7 ja keskihajonta 1,2 (taulukko 11). B-ryhmän muuttujien keskiarvo on korkeampi kuin A-ryhmän keskiarvo, ja muuttujien keskihajonta on pienempi eli muuttujissa on vähemmän hajontaa kuin A-ryhmän arvoissa. Tulosten perusteella Gomori-värjäys kudosmorfologian osalta on onnistunut paremmin B-ryhmän näytteillä.

Van Gieson-värjättyjen A-näytteiden kudismorfologian värjäntymisen keskiarvo oli 4,8 ja keskihajonta 0,4 (taulukko 7). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo 4,2 ja keskihajonta 0,4 (taulukko 9). A- ja B-ryhmän muuttujien keskihajonta on yhtä suuri eli havaintoarvot keskittyvät lähelle toisiaan. Keskiarvon perusteella A-ryhmän näytteet ovat saaneet hieman parempia arvosanoja eli Van Gieson-värjäys kudismorfologian osalta on onnistunut hieman paremmin A-näytteillä.

Solumorfologian osalta hematoksyliini-eosiinivärjäyksessä, A-näytteiden keskiarvo oli 4,5 ja keskihajonta 0,7 (taulukko 7). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo oli 4,6 ja keskihajonta 0,5 (taulukko 11). B-ryhmän muuttujien keskihajonta on pienempi ja keskiarvo suurempi kuin A ryhmän muuttujilla. Tulosten perusteella solumorfologinen värjäytyminen onnistui paremmin B-ryhmän näytteillä. Kuviossa 10 on A- ja B-näytteiden keskihajontojen vertailu solumorfologian osalta. Keskihajontojen vertailussa matalampi pylväs edustaa parempaa tulosta.



Kuvio 10. A- ja B- näytteiden kudismorfologinen keskihajontojen vertailu

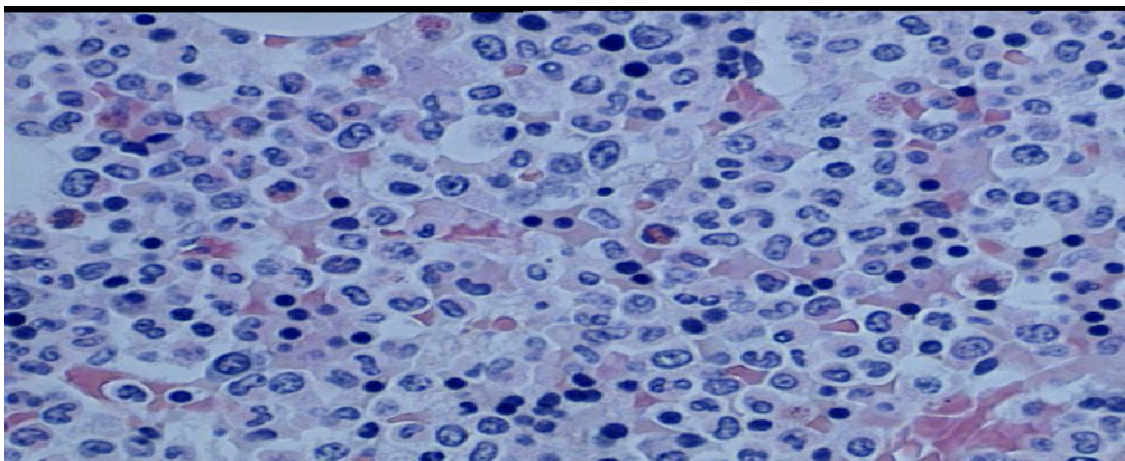
Gomori-värjättyjen A-näytteiden solumorfologian värjäntymisen keskiarvo on 2,6 ja keskihajonta 1,8 (taulukko 7). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo on 3,3 ja keskihajonta 0,7 (taulukko 9). B-ryhmän näytteiden arvosanojen keskiarvo on korkeampi ja keskihajonta pienempi kuin A-ryhmän eli muuttujissa on vähemmän hajontaa kuin A-ryhmän havaintoarvoissa. Tulosten perusteella Gomori-värjäys solumorfologian osalta on onnistunut paremmin B-ryhmän näytteillä.

Van Gieson-värjättyjen A-näytteiden solumorfologian värjäntymisen keskiarvo oli 4,5 ja keskihajonta 0,7 (taulukko 7). B-näytteiden värjäyksen keskiarvo oli 3,8 ja keskihajonta 0,6 (taulukko 9). B-ryhmän näytteillä keskihajonta on pienempi kuin A-ryhmän näytteillä, mutta keskiarvon perusteella A-ryhmän näytteet ovat saaneet parempia arvosanoja kuin B-ryhmän näytteet eli Van Gieson-värjäys on solumorfologian osalta onnistunut paremmin A-näytteillä.

8.2 Johtopäätökset

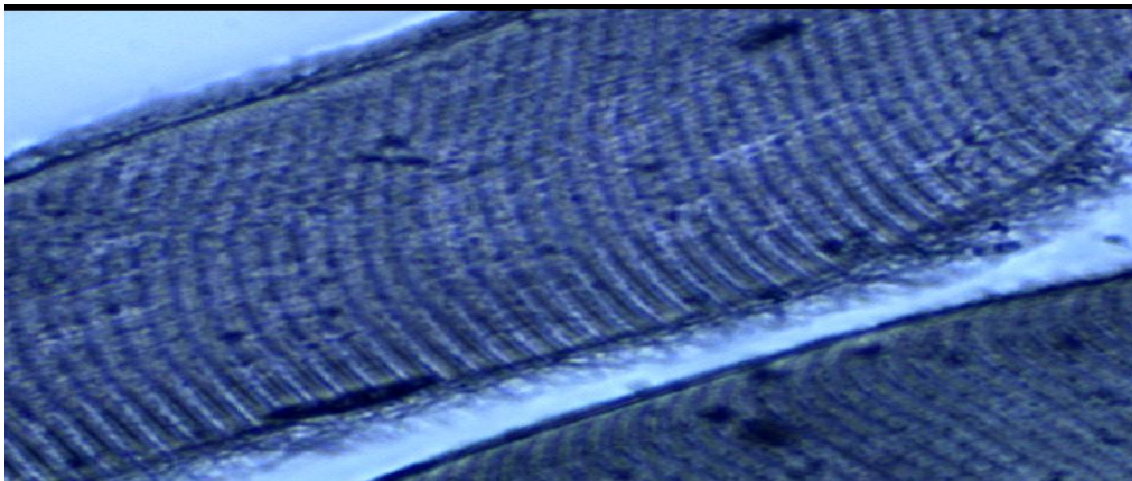
Tutkimuksessa tarkasteltiin, vaikuttaako mikroaaltouunimenetelmällä EDTA-liuoksessa dekalsifointi kovakudosnäytteen värjäytyvyyteen. Tilastollisen arvioinnin pohjalta voidaan päätellä, että mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifoidut näytteet eivät poikkea värjäytyvyydeltään huoneenlämmössä dekalsifoiduista näytteistä, vaan olivat joidenkin värjäysten osalta parempia.

Tutkimuksessa vertailtiin, eroaako mikroaaltouunimenetelmällä EDTA-liuoksessa dekalsifioitujen kovakudosnäytteiden värjäytyvyys, huoneenlämmössä EDTA-dekalsifioitujen näytteiden värjäntymisestä. Hematoksyliini-eosiinivärjäyksissä mikroaaltouunikäsitellyt näytteet olivat parempia, mutta kudismorfologiselta värjäytymiseltään huonompia kuin huoneenlämmössä dekalsifoidut näytteet. Kuvassa 2 on hematoksyliini-eosiinivärjätty, mikroaaltouunilla dekalsifiotu kovakudosnäyte.



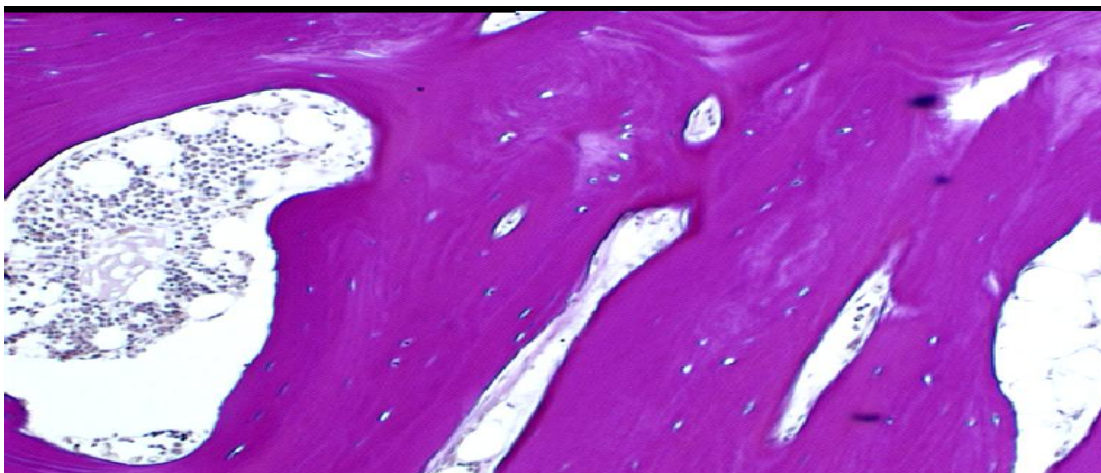
Kuva2. Hematoksyliini-eosiinivärjäys mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifoidulle näytteelle (Ryynänen, P. 2009.)

Gomori-värjäyksessä mikroaaltouunimenetelmällä käsitellyt näytteet olivat parempia kuin huoneenlämmössä dekalsifoidut näytteet. Kuvassa 3 on Gomori-värjätty, mikroaaltouunilla dekalsifioitu kovakudosnäyte.



Kuva 3. Gomori-värjäys mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifoidulle näytteelle (Ryynänen 2009.)

Van Gieson-värjäyksessä huoneenlämmössä käsitellyt näytteet olivat parempia kudos- sekä solumorfologiselta osalta kuin mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifoidut näytteet. Kuvassa 4 on Van Gieson-värjätty, mikroaaltouunilla dekalsifioitu kovakudosnäyte.



Kuva 4. Van Gieson-värjäys mikroaaltouunimenetelmällä dekalsifoidulle näytteelle (Ryynänen 2009.)

8.3 Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida validiteetin (pätevyys) ja reliabiliteetin (luotettavuus) avulla. Validiteetilla tarkoitetaan mittarin hyvyttä tai pätevyttä mitata juuri sitä, mitä on tarkoituskin mitata. Reliabiliteetilla tarkoitetaan tulosten tarkkuutta sekä sitä, etteivät tulokset ole sattumanvaraisia. Luotettavalta tutkimukselta vaaditaan toistettavuutta samanlaisin tuloksin. (Heikkilä 2004, 187). Tämän tutkimuksen validiteetti ja reliabiliteetti on saatu aikaan huolellisella suunnittelulla sekä avoimuudella tulosten arvioinnissa.

Mikroaaltouuniin kuului magneettisekoittaja, joka ei tutkimusta tehdessä toiminut. Sekoittajan tarkoituksena oli pitää EDTA-liuos liikkeessä näytteiden ympärillä ja sen toimimattomuus on voinut vaikuttaa jonkin verran dekalsifointinopeuteen. Näytteet laitettiin kooltaan suuriin näytekasetteihin, jotka eivät sopineet näytekaruselliin. Näytekasetit aseteltiin dekalsifioitumista varten histomodulin pohjalle pystyasentoon, jolloin näytteen ylä- tai alapuoli ei ollut lasiastian pohjaa vasten. Tällä varmistettiin, että näytteet olivat paremmassa kosketuksessa EDTA-liuokseen. Tutkimusta ei tehty perättäisinä päivinä, vaan se ajoittui useammalle päivälle. Tutkimusten välipäivinä näytteitä säilytettiin EDTA-liuoksessa, jolloin dekalsifioitumista tapahtui huoneenlämpötilassa. Näytteille tehtiin ennen mikroaaltouunissa tapahtuvaa dekalsifointia neulatestit, jolla arvioitiin dekalsifoinnin etenemistä ja tehtiin päätös mikroaaltouunikäsittelyn ajasta. Mikroaaltouuni oli yhtenä tutkimuspäivänä epäkunnossa, mutta huoltotoimenpiteiden jälkeen toimintakuntoinen. Mikroaaltouunin korjaus viivytti tutkimusta yhdellä vuorokaudella, millä ei ole tutkimuksen kannalta merkitystä tuloksiin. Tässä opinäytetyössä esitutkimus tehtiin näytteillä B1 ja B2. Esitutkimuksella arvioitiin dekalsifointiin kuluvaa aikaa mikroaaltouunissa.

Eettisesti hyväksyttävä tutkimus on suoritettu hyvän tieteellisen käytännön mukaan siten, että tutkimuksesta saadut tulokset ovat luotettavia ja uskottavia. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu, että tutkija noudattaa rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta tutkimustyössään sekä avoimuutta saatujen tulosten arvioinnissa. Hyvän tieteellisen käytännön mukaista on, että tutkimus on suunniteltu, toteutettu sekä raportoitu yksityiskohtaisesti. Tutkijan on käytettävä tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisia ja eettisesti hyväksyttäviä tiedonhankinta-,

tutkimus- ja arviointimenetelmiä sekä otettava huomioon muiden tutkijoiden työ ja savutukset. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2002.)

Hematoksyliini-eosiinivärjätyistä objektilaseista A3- ja B3-näyte oli irronnut värjäyksen aikana, ja näistä näytteistä tehtiin uudet leikkeet plussalaseille sekä värjättiin uudelleen. Leikkeitä tehtäessä näytteestä B3 kävi ilmi, että leike oli kova sisältä, leike ei oikene vesihauteessa ja näyte repeilee leikatessa sekä näyte A3 oli myös kova sisältä. Edellä mainituista syistä voi johtua, etteivät leikkeet pysyneet värjäysvaiheessa objektilaseilla. Mikrotomilla leikkaamisen suoritti kokenut bioanalyytikko, ja leikkeiden mikroskooppisen arvioinnin suoritti patologi. Tutkimuksen tekijällä ei ollut riittävästi ammattitaitoa mikrotomilla leikkamiseen eli tutkimustulosten kannalta kokeneen bioanalyytikon tekemät leikkeet objektilaseille lisäävät tutkimuksen luotettavuutta. Tutkimuksen aikana pidettiin tutkimuspäiväkirjaa, johon merkittiin tutkimuksen kulku sekä havainnot. Tutkimuspäiväkirja toimi tutkijan päätöksenteon apuvälineenä sekä ohjasi tutkimusta oikeaan suuntaan.

Tätä opinnäytetyötä tehdessä on otettu huomioon hyvään tieteelliseen käytäntöön liittyvät eettiset kysymykset. Tuloksia on käsitelty rehellisesti ja kriittisesti, sekä niitä on käsitelty tilastollisia tutkimusmenetelmiä hyväkäsikäyttäen. Tutkimus on suunniteltu ja toteutettu laboratoriossa olevien menetelmä- ja työohjeita noudattaen, sekä tutkimukselle hankittiin tutkimuslupa. Suurempi otoskoko olisi lisännyt tutkimuksen luotettavuutta.

8.4 Tutkimuksen hyödynnettävyys sekä jatkotutkimusaiheet

Tutkimusta voidaan hyödyntää kovakudosnäytteiden dekalsifioinnissa patologian laboratoriossa. Mikroaaltouunimenetelmä on hyvä vaihtoehto silloin, kuin halutaan lyhentää kovakudosnäytteiden dekalsifioitumiseen kulunutta aikaa. Jatkotutkimuksena voisi tehdä mikroaaltouunimenetelmällä ja huoneenlämmössä dekalsifioitujen kovakudosnäytteiden leikkautuvuuden vertailun.

LÄHTEET

- Aho, H. 1994. Histologiset menetelmät patologiassa. Turku. Turun yliopisto, kliinis-teoreettinen laitos, patologia.
- Alers, J.C., Krijtenburg, P.-J., Vissers, K. J. & Dekken, H. 1999. Effect of Bone Decalcification Procedures on DNA In Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization: EDTA Is Highly Preferable to a Routinely Used Acid Decalcifier. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47(5), 703–709.
- Bancroft, J.D. & Spencer, L.T. 2008a. *Microtomy: Paraffin and Frozen. Tissue Processing. Theory and practice of histological techniques.* China. British Library Cataloguing in Publication Data.
- Bancroft, J.D. & Spencer, L.T. 2008b. *Tissue Processing. Theory and practice of histological techniques.* China. British Library Cataloguing in Publication Data
- Billings, P.E. & Grizzle, W.E. 2008. *The GrossRoom/Surgical Cut up. Theory and practice of histological techniques.* China. British Library Cataloguing in Publication Data.
- Boon, M. & Kok, L.P. 1992. *Microwave Cookbook of Pathology, the Art of Microscopic Visualization.* Leiden: Coulomb Press Leiden.
- Burkitt, H. G., Young, B. & Heath, J. W. 1996. *Functional Histology a text and colour atlas.* Livingstone. British library cataloguing in publication data.
- Callis, G.M. 2008. *Tissue Processing. Theory and practice of histological techniques.* China. British Library Cataloguing in Publication Data.
- Chiras, D. 1999. *Human Biology, health, homeostasis and the environment.* Sudbury. Jones and Bartlett Publisher. Library of Congress Cataloguing-in-Publication Data.
- Gamble, M. 2008. *The Hematoxylins and Eosin. Theory and practice of histological techniques.* China. British Library Cataloguing in Publication Data.
- Grizzle, W.E., Fredenburgh, G.L. & Myers, R.B. 2008. *Fixation of Tissues. Theory and practice of histological techniques.* China. British Library Cataloguing in Publication Data.
- Heikkilä, T. 2004. *Tilastollinen tutkimus.* Helsinki: Edita.
- Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2008. *Tutki ja kirjoita.* Helsinki: Kirjayhtymä Oy.
- Huhtakallio, J. 1995. *Patologian perusteet ja menetelmät.* Oulu: Oulun Liikekirjapaino.
- Kaila, K. 1998. *Kudoskuljetuksen yhteys kudosnäytteen ominaisuuksiin. Pro gradu.* Oulun yliopisto. Hoitotieteen ja terveyshallinnon laitos, kliinisen laboratoriotieteen suuntautumisvaihtoehto.
- Karjalainen, L. 2004. *Tilastomatematiikkaa.* Jyväskylä: Gummerus.
- Keithley, E., Truong, T., Chantronait, R. & Billings, P. 2001. Using the Microwave oven for Decalcification of Human Temporal Bones. *News letter of the NICDCD National Temporal Bone* 9 (1).
- Kylmäoja, E. 2009, *Mikroskooppi.* (Lehtonen, S. 2011, päivitetty). Oulun Yliopisto. *Histologian harjoitustyö H1*

- Lehtonen, P.O., Jaarinen, S., Johansson, K., Pohjakallio, M. & Repo, R. 2004. Laboratorioalan fysiikka ja fysikaalinen kemia. Vantaa: Opetushallitus.
- Micromed T/T. 2001. Handbook. Milestone microwave laboratory systems.
- Minshew, J. & Willis, D. 2002. Microwave Technology in the Histology Laboratory. *Histologic-Technical Bulletin for Histotechnology* 1, 1-5.
- Morales, A.R., Nassiri, M., Kanhoush, R., Vincek, V. & Nadji, M. 2004. Experience With an Automated Microwave-Assisted Rapid Tissue Processing Method. *American Journal of Clinical Pathology* 121, 528-536
- Mäkelä, E.A., 2001. Luutuumorit. *Duodecim* 117, 2205–2214. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim
- Naukkarinen, A. 2000. Histologiset värjäykset. *Moodi* 4-5/2000,153–154.
- Nobac, C.R., Carola, R. & Van Wynsberghe, D. 1995. *Human Anatomy and physiology*. New York: McGraw-Hill Companies.
- Nyberg, H. & Jokela, K. 2006. Ionisoimaton säteily, Sähkömagneettiset kentät. Säteilyturvakeskus. Hämeenlinna: Kairisto Oy.
- Pohjois-Karjalan sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä. 2008. Patologian yksikön toimintakäsikirja. N: o 12 / 12.8.2008. HE.
- Rohr, L.R., Layfield, L.J., Wallin, D. & Hardy, D. 2001. A Comparison of Routine and Rapid Microwave Tissue Processing in a Surgical Pathology Laboratory. *American Society of Clinical Pathologists* 115, 703–708
- Ryynänen, P. 2009. Kuva.
- Ryynänen, P. 2011. Kuva mukaillen eri lähteistä.
- Tikkakoski, T., Lähde, S., Puranen, J. & Apaja-Sarkkinen, M. 1993. Luupesäkkeiden tietokonetomografiaohjauksinen näytteenotto. *Duodecim* 109 (2), 119–125.
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2002. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausten käsitteleminen.
<http://www.tenk.fi/HTK/htkfi.pdf> (8.10.2011)

PATOLOGIAN YKSIKÖN TOIMINTAKÄSIKIRJA, PKSSK
Laatija: stuu, hluo
Hyväksyjä: slee

3/3
Kansio n:o 12/10.5.2010
HE

10. Työn suoritusvaiheet

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

Päällystä näytelasit peitinkalvoautomaatilla.

11. Tulos ja sen tulkinta

Tuma sinimusta

Sytoplasma, lihaskuidut, kollageeni, punasolut ja fibriini ovat eriasteista vaa-
leanpunaista

10. Weigert - Van Gieson -värjäys: Työn suoritusvaiheet

1. Ksyleeni	5 min
2. Ksyleeni	5 min
3. Abs. etanoli	2 min
4. Abs.etanoli	2 min
5. 96 % etanoli	2 min
6. 96 % etanoli	2 min
7. Weigertin hematoksyliiniliuos	20 min
8. Juokseva vesi	10 min
9. Van Gieson -liuos	3 min
10. Aqual dest.	huuhtelu
11. Aqual dest.	huuhtelu
12. 96 % etanoli	huuhtelu
13. 96 % etanoli	huuhtelu
14. Abs.etanoli	huuhtelu
15. Abs.etanoli	huuhtelu
16. Ksyleeni	2,5 min
17. Ksyleeni	2,5 min

11. Tulos ja sen tulkinta

Tumat värjäytyvät tummanruskeiksi, sidekudos punaiseksi ja muu kudos (lihas, punasolut) keltaiseksi tai kellanruskeaksi.

P-KSHP ky.
Patologian yksikkö
SLEE/met

Joensuu 15.8.2003
gomorin retikkelivärjäys
värjäysohjeet sivu 5 (6)

10. GOMORIN RETIKKELIVÄRJÄYS: Työn suoritusvaiheet muovipinsetit

- | | | | |
|-----|---|-----------|-----------------------------|
| 1. | Xyleeni | 2,5 min | |
| 2. | " | 2,5 min | |
| 3. | Abs. Etanoli | 1 - 2 min | |
| 4. | " | 1 - 2 min | |
| 5. | 96 % etanoli | 1 - 2 min | |
| 6. | " | 1 - 2 min | |
| 7. | Juokseva vesi/Aqua | 2 min | |
| 8. | 0,5 % Kaliumpermanganaatti | 1 min | oksidointi herkistää |
| 9. | Juokseva vesi | 2 min | |
| 10. | 2 % Kaliumsulfaatti | 1 min | ruskea artefakta poistetaan |
| 11. | Juokseva vesi | 2 min | |
| 12. | 2 % Ammoniumferrisulfaatti | 1 min | herkistää kudosta hopealle |
| 13. | Juokseva vesi | 2 min | |
| 14. | Aqua-huuhtelu | | |
| 15. | Ammoniakki-hopealiuos | 1 min | |
| 16. | Aqua | 20 sek | |
| 17. | 20 % Formaliini | 3 min | pelkistys |
| 18. | Juokseva vesi | 3 min | |
| 19. | 0,2 % Kultakloridi | 10 min | sävytys |
| 20. | Juokseva vesi t. Aqua-huuhtelu | | |
| 21. | 2 % Kaliumsulfaatti | 1 min | pysäytetään kultasävytys |
| 22. | 2 % Natriumthiosulfaatti | 1 min | poistetaan ylim. hopea |
| 23. | Juokseva vesi | 2 min | |
| 24. | 96 % etanoli | 1 min | |
| 25. | 96 % | 1 min | |
| 26. | Abs. etanoli | 1 min | |
| 27. | Abs. etanoli | 1 min | |
| 28. | Xyleeni | 2,5 min | |
| 29. | " | 2,5 min | |
| 30. | Päällystetään peitinkalvoautomaatilla tai sopivan kokoisella peitinlasilla ja Depex-valmisteella. | | |

SEURANTA LOMAKE

Dekalsifointi EDTA liuoksella

Aloitus päivämäärä 9.9.2010 Klo_____

Neulatesti**Näyte**

pvm	Klo	A1	A2	A3
kova				
puolikova				
pehmeä				
Dec.lopetus				

Muut huomiot:

Neulatesti**Näyte**

pvm	Klo	A1	A2	A3
kova				
puolikova				
pehmeä				
Dec.lopetus				

Muut huomiot:

Neulatesti**Näyte**

pvm	Klo	A1	A2	A3
kova				
puolikova				
pehmeä				
Dec.lopetus				

Muut huomiot:

Värjäysten arviointi**HE- värjäyksen ja kudismorfologian arviointikriteerit ja arviointiasteikko**

0 = negatiivinen, epäonnistunut

1 = niukasti värjäätynyt

2 = heikosti värjäätynyt

3 = hyvä, ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta

4 = lähes moitteeton, lievää ali- tai ylivärjäntymistä, vähäistä epätasaisuutta

5 = erinomainen

Huoneenlämmössä sekä mikroaaltouunissa dekalsifioitujen näytteiden arviointi**Kudosleikkeiden värjäytyminen:**

Luukudos	0	1	2	3	4	5
Luuydin	0	1	2	3	4	5
Side-, lihaskudos	0	1	2	3	4	5

Kudismorfologian säilyminen:

Luukudos yksittäisten solujen erottuminen	0	1	2	3	4	5
– tuman rakenne	0	1	2	3	4	5
Pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen	0	1	2	3	4	5
– tuman rakenne	0	1	2	3	4	5

Kommentit

Tuman rakenteen arvioinnissa otettu huomioon tuman eri osien erottuminen kuten kromatiini, nukleolit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

A1 Selkäranka (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

A1	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE**

B1 Selkäranka (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

B1	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen				x		
– tuman rakenne			x			

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori**

A1 Selkäranka (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

A1	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen	x					
– tuman rakenne	x					
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen				x		
– tuman rakenne	x					

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori

B1 Selkäranka (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B1	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen	x					
– tuman rakenne	x					
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen				x		
– tuman rakenne				x		

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

A1 Selkäranka (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

A1	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne						x

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

B1 Selkäranka (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B1	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen				x		
– tuman rakenne			x			

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

A2 Kylkiluu (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

A2	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne						x

Kommentit

Rustoa 90 %, pieni luu

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

B2 Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos (ei luuta, rustoa)	x					
luuydin (ei)	x					
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

B2	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen	x					
– tuman rakenne						x
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen	x					
– tuman rakenne					x	

Kommentit

Näyte koostuu rustosta ja side ja lihaskudoksesta

Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori

A2 Kylkiluu (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos				x		

Kudosmorfologian säilyminen:

A2	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne				x		

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori

B2 Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos (ei)	x					
luuydin (ei)	x					
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B2	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen (rustoa)					x	
– tuman rakenne			x			
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

A2 Kylkiluu (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

A2	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

B2 Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos (rustoa)					x	
luuydin (ei)	x					
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

B2	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen (rustoa)				x		
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne				x		

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

A3 Solisluu (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos				x		
luuydin						x
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

A3	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne						x
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne						x

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE**

B3 Solisluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin						x
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B3	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne						x
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne						x

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori**

A3 Solisluu (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin	x					
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

A3	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne			x			
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori

B3 Solisluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos	x					

Kudosmorfologian säilyminen:

B3	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne			x			
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne			x			

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

A3 Solisluu (huoneen lämmössä)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

A3	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

B3 Solisluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B3	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne					x	

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

B4 I Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin				x		
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B4 I	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori**

B4 I Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos				x		
luuydin				x		
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B4 I	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

B4 I Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B4 I	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

B4 II Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin						x
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B4 II	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori**

B4 II	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B4 II	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

B4 II Kylkiluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B4 II	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne					x	

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

B5 I Suoliluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

B5 I	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori**

B5 I Suoliluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin					x	
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

B5 I	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen				x		
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

B5 I Suoliluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos						x
luuydin						x
side-, lihaskudos						x

Kudosmorfologian säilyminen:

B5 I		1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit

Kudosleikkeiden värjäntyminen: HE

B5 II Suoliluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin						x
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B5 II	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne					x	

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Gomori**

B5 II Suoliluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos				x		
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B5 II	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen				x		
– tuman rakenne			x			
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		

Kommentit**Kudosleikkeiden värjäntyminen: Van Gieson**

B5 II Suoliluu (mikroaaltouuni)	0	1	2	3	4	5
luukudos					x	
luuydin					x	
side-, lihaskudos					x	

Kudosmorfologian säilyminen:

B5 II	0	1	2	3	4	5
luukudos yksittäisten solujen erottuminen					x	
– tuman rakenne				x		
pehmytkudos yksittäisten solujen erottuminen						x
– tuman rakenne				x		

Kommentit

DEKALSIFIOINNIN SEURANTA

Dekalsifiointi EDTA liuoksella huoneen lämmössä

Tutkimuksen aloitus päivämäärä 9.9.2010 Klo 10.00, 20 °C

Näyte	Dec.aloitus pvm.
A1	9.9.10
A2	9.9.10
A3	13.9.10
A4	
A5	
A6	

Neulatesti**Näyte**

pvm	17.9	Klo	7.30	A1	A2	A3
kova					x	x
puolikova				x		
pehmeä						
*Dec.lopetus						

*Dekalsifioinnin lopetus

Lämpötila 20 °C**Muut huomiot:** A1 näytteessä vähän kovaa luuta**Neulatesti****Näyte**

pvm	24.9	Klo	8.00	A1	A2	A3
kova					x	x
puolikova				x	x	x
pehmeä				x		
*Dec.lopetus						

*Dekalsifioinnin lopetus

Lämpötila 20 °C**Muut huomiot:**

A3 sisäreunasta puolikova ulkoreuna kova

A2 sisäreunasta kova, vaalea ulkokuori puolikova

A1 tumma osa pehmeä, vaalea osa puolikova

Neulatesti**Näyte**

pvm	28.9	Klo	7.45	A1	A2	A3
kova					x	x
puolikova				x	x	x
pehmeä				x		
*Dec.lopetus						

*Dekalsifioinnin lopetus

Lämpötila 20 °C**Muut huomiot:** EDTA vaihdettu

Neulatesti**Näyte**

pvm 5.10	Klo 7.30	A1	A2	A3
kova				
puolikova			x	x
pehmeä		x		
*Dec.lopetus		x		

*Dekalsifioinnin lopetus

Lämpötila 20 °C

Muut huomiot:

A2 joiltain osin kovuutta
A3 yhdeltä reunalta kova
A3 käyntiinpanoon

Neulatesti**Näyte**

pvm 7.10	Klo 14.00	A1	A2	A3
kova				
puolikova			x	
pehmeä			x	x
*Dec.lopetus				x

*Dekalsifioinnin lopetus

Lämpötila 20 °C

Muut huomiot:

A2 osittain pehmeä → ma – ti
A3 käyntiinpanoon

Neulatesti**Näyte**

pvm 12.10	Klo 9.30	A1	A2	A3
kova				
puolikova				
pehmeä			x	
*Dec.lopetus			x	

*Dekalsifioinnin lopetus

Lämpötila 20 °C

Muut huomiot:

A2 luukudos lohkeilevaa, käyntiinpanoon

Näytteiden leikkautuvuuden arviointia

Näyte	Arviointi
A1 selkäranka	leikkautui hyvin
A2 kylkiluu	leikkautui, mutta on hiukan kova – hyvät leikkeet
A3 solisluu	hiukan kova, ratisee
B1 selkäranka	leikkautui hyvin
B2 kylkiluu	leikkautui hyvin, mutta osittain kovia kohtia näytteessä
B3 solisluu	B3 kova leikatessa, kova syvemmältä, uudelleen leikatessa leike hajoaa, säleinen – leike ei oikene kunnolla vesihauteessa – repeilee leikatessa
B4 I kylkiluu	leikkautui hyvin
B4 II kylkiluu	leikkautui hyvin
B5 I suoliluu	leikkautui hyvin
B5 II suoliluu	leikkautui hyvin