

Heidi Kemppainen

Histologisten konevärjäysten virhelähteet

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikko (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
29.1.2013

Tekijä Otsikko	Heidi Kemppainen Histologisten konevärjäysten virhelähteet
Sivumäärä Aika	45 sivua + 7 liitettä 29.1.2013
Tutkinto	Bioanalyytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Sosiaali- ja terveysala
Ohjaaja	Lehtori Päivi Haapasalmi Bioanalyytikko Sanna Aakko Bioanalyytikko Kirsi Eberhardt
<p>Histologiset tekniikat ovat kehittyneet paljon viimeisten vuosikymmenten aikana. Uusi- en ja vanhojen tekniikoiden avulla voidaan saavuttaa koko ajan enemmän tietoa ja tämän vuoksi laboratoriohenkilökunnan onnistunut koulutus on avainasemassa. Lopputyöni tarkoituksena oli valmistaa opetusmateriaali yleisimpien histologisten konevärjäysten virhelähteistä helpottamaan histologisten leikkeiden tulkintaa. Opetusmateriaali tulee toimimaan HUSLABin uusien työntekijöiden sekä opiskelijoiden perehdyttämismateriaalina sekä Metropolia ammattikorkeakoulun opiskelijoiden opetusmateriaalina.</p> <p>Opetusmateriaalia valmistettaessa, täytyy ottaa huomioon erilaiset oppijat. Oppimistyy- lejä on yhtä monta kuin oppijoitakin. Yleisimmin käytetyistä jaoista on tapa, jossa op- pimistyylijako tehdään tiedonsaantitavan mukaan. Tällöin puhutaan visuaalisesta, audi- tiivisesta ja kinesteettisestä tiedonhankinnasta ja oppimistavasta. Työssäni keskityin histologisten konevärjäysten virhelähteiden kokoamiseen opetusmateriaaliksi. Ennen histologisia värjäyksiä, tutkittava kudokseksi saatetaan sellaiseen muotoon, että sitä voidaan tarkastella mikroskooppisesti. Prosessi sisältää useita erilaisia työvaiheita, joihin liittyy myös virheiden tapahtumisen mahdollisuus. Käyttämäni perusvärjäykset ovat hema- toksyliini-eosiinivärjäys, periodic acid Schiff-värjäys, Alcian Blue-periodic acid Schiff- värjäys, Herovici-värjäys ja Giemsa-värjäys.</p> <p>Opetusmateriaalin avulla useita värjäysvirheitä voidaan nyt havainnollistaa paremmin. Tulosten mukaan osa värjäysten virhelähteistä on kudosspesifisiä, toisessa kudoksessa virhelähde näkyy voimakkaammin kuin toisessa. Osa virhelähteistä on kudostyyppistä riippumattomia. Leikkeet, jotka oli prosessoitu mikroaaltoja apuna käyttäneellä kudok- sprocessorilla, värjäytyivät voimakkaammin. Tulosten mukaan paksumpi leike värjäytyi selkeästi ohutta voimakkaammin. Liian paksu leike vaikeuttaa selvästi kudoksen raken- teen ja solujen tumien rakenteiden erottamista.</p>	
Avainsanat	Opetusmateriaali, histologinen värjäys, virhelähde

Author Title	Heidi Kemppainen Histological staining errors
Number of Pages Date	45 pages + 7 appendices 29 January 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Health Care and Social Services
Instructor(s)	Päivi Haapasalmi, Lecturer Sanna Aakko, Biomedical Laboratory Scientist Kirsi Eberharfdt, Biomedical Laboratory Scientist
<p>Histological techniques have been developed a lot during last decades. With new and old techniques can be achieved more new information and that's why it is important to invest educating laboratory personnel. The aim of my thesis was to prepare learning material concerning errors of most routine histological stains. HUSLAB and Metropolia will use this learning material as a help when training their new employees and students.</p> <p>When preparing learning material, one has to take into account that people learn different ways. There are many ways to learn. Commonly learning styles can be divided into three category: the visual, auditory and kinesthetic learning. In this thesis I have gathered together the most common histological staining errors. Before histological staining, tissue must be processed in the histology laboratory to produce microscopic slides that are viewed under the microscope. The staining process uses a variety of dyes that have been chosen for their ability to stain various cellular components of tissues. The process from fixation to the staining includes different stages where errors can happen. The routine stains which I used in this thesis are hematoxylin and eosin, periodic acid Schiff, Alcian Blue periodic acid Schiff, Herovici and Giemsa staining.</p> <p>According to achieved results part of the staining errors are specific for certain tissues. In other words, part of the tissues stains more powerful than others. One can also see wrongly coloured stains which are not dependent on type of tissue. Tissues which were processed with a help of microwave-processor, did stain more efficiently. Also the thickness of sectioned tissues effect on the staining result. The thick sections stain more powerful. Because of the too many cell layers in thick section, there will be difficulties to identify structures of tissue and nucleus.</p>	
Keywords	Learning material, histological staining, error

Sisällysluettelo

1	Johdanto	1
2	Opetumateriaali histologisten konevärjäysten virhelähteistä	1
2.1	Oppimisen erilaiset tyylit	2
2.2	Fiksoiminen	4
2.3	Kudosprosessointi	7
2.3.1	Kudosprosessoinnin erojen vaikutus histologisiin konevärjäksiin	8
2.4	Valu parafiiniin ja mikrotomia	9
2.4.1	Leikepaksuuden vaikutus histologiseen värjäystulokseen	9
2.5	Väriaineista ja värjäysmenetelmistä	10
2.5.1	Hematoksyliini-eosiini-värjäys	11
2.5.2	Periodic Acid Schiff	12
2.5.3	Alcian Blue -Periodic Acid Schiff	13
2.5.4	Herovici	14
2.5.5	Giemsa	15
2.6	Konevärjäysten virhelähteet	16
2.6.1	Koneellisen HE-värjäyksen virhelähteet	17
2.6.2	Koneellisen PAS-värjäyksen virhelähteet	17
2.6.3	Koneellisen AB-PAS-värjäyksen virhelähteet	17
2.6.4	Koneellisen Herovici-värjäyksen virhelähteet	18
2.6.5	Koneellisen Giemsa-värjäyksen virhelähteet	18
2.7	Objektilasien peittäminen	19
2.8	Tutkimustehtävät	19
3	Materiaalit ja menetelmät	20
3.1	Reagenssit	20
3.2	Kudokset, niiden käsittely, valaminen ja leikkaaminen leikkeiksi	20
3.3	Histologiset konevärjäykset	21
3.3.1	HE-värjäyksen suoritus	21
3.3.2	PAS-värjäyksen suoritus	22
3.3.3	AB-PAS-värjäyksen suoritus	22
3.3.4	Herovici-värjäyksen suoritus	23

3.3.5 Giemsa-värjäyksen suoritus	23
3.4 Mikroskopointi ja leikkeiden kuvaaminen	23
4 Koneellisten värjäysvirhelähteiden tulokset	23
4.1. Kudosprosessoinnin laite-erojen vaikutus histologisiin konevärjäyksiin	24
4.2 Leikepaksuuden vaikutus histologisissa konevärjäyksissä	26
4.3 HE-värjäyksen virhelähteet	27
4.4 PAS-värjäyksen virhelähteet	30
4.5 AB-PAS-värjäyksen virhelähteet	32
4.6 Herovici-värjäyksen virhelähteet	35
4.7 Giemsa-värjäyksen virhelähteet	38
5 Yhteenveto	40
6 Pohdinta	41
7 Kirjallisuutta	43

1 Johdanto

Patologia tulee kreikankielen sanoista pathos ja logos. Pathos tarkoittaa tunnetta, kipua ja kärsimystä, logos taas tarkoittaa oppia. Patologian tarkoituksena on selvittää solujen, kudosten ja elinten rakenteita ja niihin kohdistuvia muutoksia erilaisissa sairaustiloissa. Patologisissa tutkimuksissa käytetään erilaisia molekulaarisia, mikrobiologisia, immunologisia ja morfologisia menetelmiä ja näiden tutkimusten avulla voidaan auttaa potilaan hoidon suunnittelua. Peruspatologiassa sairaus voidaan jakaa neljään osaan: syy, taudin kehittymekanismit, solujen ja elinten muutokset ja kliiniset oireet. Perinteisesti patologia jaetaan kahteen osaan: yleiseen ja elinkohtaiseen patologiaan (Suomen virtuaali yliopisto Solunetti. 2006).

Merkittävä osa patologianlaboratorioon saapuvista näytteistä on kasvaimia ja tutkittavaksi saadaan isojakin kudosresekateja. Histologisista näytteistä tehdään tietyt perusvärjäykset. Tarvittaessa - lähinnä tuumorin tyypitystä tai prognoosin arviointia varten - voidaan tehdä erikoistutkimuksia tai ottaa tuoreena lähetettyä näytettä talteen mahdollista kromosomi- tai sytomolekyyliogeneettistä tutkimusta varten. Nykyään otetaan rutiiniluontoisesti myös runsaasti sekä histologisia biopsianäytteitä että sytologisia näytteitä erilaisten tähytysten yhteydessä (HUS. 2012).

Histologiset tekniikat ovat kehittyneet paljon viimeisten vuosikymmenien aikana. Uusien ja vanhojen tekniikoiden avulla voidaan saavuttaa enemmän tietoa ja tämän vuoksi laboratoriohenkilökunnan onnistunut koulutus on tärkeässä asemassa. Lopputyöni tarkoituksena on valmistaa opetusmateriaali histologisten konevärjäysten virhelähteistä helpottamaan histologisten leikkeiden tulkintaa. Työssä ei oteta kantaa kudosten solubiologisiin rakenteisiin. Opetusmateriaali tulee toimimaan HUSLABin uusien työntekijöiden sekä opiskelijoiden perehdyttämismateriaalina sekä Metropolia ammattikorkeakoulun opiskelijoiden opetusmateriaalina. Työ tehtiin HUSLABin patologian laboratoriossa, joka on yksi Euroopan suurimmista patologian diagnostisista laboratorioista. Seuraavissa kappaleissa esittelen työhön liittyvän teorian sekä saamani tulokset.

2 Opetusmateriaali histologisten konevärjäysten virhelähteistä

Opetusmateriaalia valmistettaessa, täytyy ottaa huomioon erilaiset oppijat. Oppimistyyliä on yhtä monta kuin oppijoitakin. Työssäni keskityin histologisten konevärjäysten virhelähteiden kokoamiseen opetusmateriaaliksi. Histologinen prosessi sisältää useita vaiheita. Ensin tutkittava kudos on saatettava sellaiseen muotoon, että väriaineet sitoutuvat kudokseen. Kudokset on oltava säilyvä ja mikroskooppisesti tarkasteltavissa. Prosessi sisältää useita erilaisia työvaiheita, joihin liittyy myös virheiden tapahtumisen mahdollisuus. Histologisen prosessin lopputuloksena saavutetaan objektilasille kiinnitetty leike kudoksesta, joka on värjätty pyydettyllä histologisella värjäysmenetelmällä. Histologiset värjäykset perustuvat kemiallisiin reaktioihin. Yleisimpiä histologisia perusvärjäyksiä ovat hematoksyliini-eosiinivärjäys, periodic acid Schiff-värjäys, Alcian Blue-periodic acid Schiff-värjäys, Herovici-värjäys ja Giemsa-värjäys. Seuraavissa kappaleissa perehdyn oppimisen erilaisiin tyyliin ja siihen, miten olen opetusmateriaalissani ottanut huomioon erilaiset oppijat. Lisäksi käyn läpi histologisen prosessin kuodosten fiksoimisesta kuodosten prosessointiin, mikrotomiaan ja värjäysmenetelmiin. Esittelen kappaleissa myös histologisten konevärjäysten virhelähteitä sekä kudosprosessoinnin ja leikepaksuuden vaikutuksia histologisiin värjäyksiin.

2.1 Oppimisen erilaiset tyylit

Opinnäytetyöni tehtävänä oli valmistaa opetusmateriaalia havainnollistamaan viiden histologisen konevärjäyksen yleisimpiä virhelähteitä sekä kudosprosessoinnin ja leikepaksuuden vaikutuksia histologisissa värjäyksissä. Valmistettaessa opetusmateriaalia, on otettava huomioon erilaiset oppijat, erilaiset ihmiset oppivat asioita eri tyyliillä. Tässä kappaleessa perehdyn oppimisen yleisimpiin tyyliin.

Oppiminen voidaan määritellä prosessiksi, jossa oppija muuntaa kokemuksiaan niin, että hänen tiedoissaan ja taidoissaan tapahtuu muutoksia. Oppiminen on oivaltamista ja soveltamista ja siihen vaikuttavat oppimistyylien lisäksi myös ympäristökijät. Oppimistyyli on tapa, jolla kukin parhaiten oppii. Oppimistyyliä tunnistaminen auttaa oppijaa oppimaan paremmin. Laajalti tunnettuja oppimistyylimalleja on noin 80. Yleisimmin käytetyistä jaoista on tapa, jossa oppimistyylijako tehdään tiedonsaantitavan mukaan. Tällöin puhutaan visuaalisesta, auditiivisesta ja kinesteettisestä tiedonhankinnasta ja oppimistavasta. (Eriolaisten oppijoiden liitto. 2013; Jyväskylän yliopisto. 2013; Ojala 1999:43.)

Auditiivisesti oppiva henkilö oppii asioita kuuloaistinsa avulla, tällöin korostuu kuuloaistin ja kuulemisen merkitys. Auditiivisesti oppiva kiinnittää huomiota ympärillä kuuluviin ääniin ja keskusteluihin, joten hänen kannatta minimoida kaikki ympäriltä tuleva melu ja muut häiritsevät äänet. Kuuloaistinsa avulla oppiva voi käyttää opiskelussa apuna nauhoittamista ja ääninauhojen kuuntelua sekä oppii sanallisten ohjeiden avulla. (Erialaisten oppijoiden liitto. 2013; Jyväskylän yliopisto. 2013; Ojala 1999:43.)

Kinesteettisellä oppimistyyllillä tarkoitetaan tuntohavaintoon perustuvaa oppimista. Oppimisen kannalta on tärkeää, miltä jokin asia, esine tai liike tuntuu. Kinesteettisesti oppivan kannattaa tehdä muistiinpanoja sivujen marginaaliin tai erillisille papereille. Kinesteettisesti oppiva hyödyntää muistamisessa oppimistilanteessa koettuja tuntemuksia ja kokemuksia. Myös havaintoesityksistä on hyötyä kinesteettisesti oppivalle. (Erialaisten oppijoiden liitto. 2013; Jyväskylän yliopisto. 2013; Ojala 1999: 43.)

Visuaalisella oppimistyyllillä tarkoitetaan näköhavaintoon perustuvaa oppimista. Oppimisessa korostuu näköaistin ja näkemisen merkitys. Henkilö pystyy palauttamaan mieleensä erilaisia näkömielikuvia, joiden avulla hän rakentaa uutta oppimaansa. Henkilön kannattaa käyttää oppimisessaan apuna piirroksia tai erivärisiä papereita. Mindmap-tekniikka voi olla myös hyvä apuväline. (Erialaisten oppijoiden liitto. 2013; Jyväskylän yliopisto. 2013; Ojala 1999: 43.)

Eriaiset oppijat voidaan jakaa myös toisella tavalla, neljän erilaisen oppijatyyppin mukaan: osallistuva, tarkkaileva, päättelevä ja toteuttava oppija. Osallistuva oppija kokee mieluisaksi tekemisen ja kokemuksellisuuden. Tällainen oppija nauttii käytännön toiminnasta, kaikesta sellaisesta mikä on tehokasta ja aktivoivaa. Osallistuva oppija kyllästyy toimetttömyyteen, yksin työskentelyyn ja muiden jaaritteluun. Tarkkaileva oppijatyyppi miettii, tarkkailee ja nauttii muiden katselusta. Tällainen oppija tarvitsee omaa rauhaa ja aikaa oppimiseen. Tarkkailijalle epämieluisaa on toimintaan hädistely ja tiukat aikataulut. Päättelevä oppijatyyppi oppii mieluiten analyyttisyyden ja logiikan avulla. Tämä oppijatyyppi nauttii selkeydestä ja ymmärtää abstrakteja käsitteitä. Päättelevä oppijatyyppi ei pidä ajan hukkaamisesta, aikataulujen puuttumisesta ja siitä ettei saa kyseenalaistaa. Toteuttava oppijatyyppi rat-

kaisee mielellään ongelmia käytännössä. Tällainen oppijatyyppi kysyy usein: "Miten voin soveltaa tätä?". Toteuttava oppija turhautuu liialliseen teoreettisuuteen, sillä teoreettinen oppija haluaa kiinnittää huomionsa nykyisyyteen. (Rogers 2004:37)

Yksilön oppimistyyli sisältää usein ominaisuuksia useammasta edellä mainitusta oppimistyylistä, jotkut alueet kuitenkin painottuvat toisia enemmän. (Erialaisten oppijoiden liitto. 2013; Jyväskylän yliopisto. 2013; Ojala 1999:43.) Tässä opinnäytetyössä valmistamani opetusmateriaali tukee eniten visuaalista oppijaa, sillä opetusmateriaali sisältää paljon kuvia histologisista värjäyksistä eri kudoksissa. Auditivista oppijaa varten opetusmateriaalissa on myös tekstiä, jonka voi lukea itsekseen ääneen tai opettaja voi esittää esityksen opetustunnin aikana. Osallistuvaa ja päättelevää oppijaa huomioidaan opetusmateriaalin kysymysten avulla. Tällainen kysymys on esimerkiksi: "Mieti miten tumat värjäytyvät?". Päättelevä oppijatyyppi oppii analyttisyyden ja logiikan avulla. Opetusmateriaalin ja tämän kirjallisen tuotoksen antama histologisten värjäysten teoriatausta mahdollistaa ymmärtämään miksi konevärjäysten vihelähteet eroavat oikeista kontrollivärjäyksistä. Koska opetusmateriaali on hyvin käytännönläheistä, tukee se myös toteuttavan oppijatyyppin tapaa omaksua asioita. Seuraavissa kappaleissa esittelen histologisen prosessin kudosten fiksoimisesta kudosten värjäämiseen saakka.

2.2 Fiksoiminen

Tässä kappaleessa esittelen kudosten fiksoimisen. Tutkittavan kudoksen fiksoiminen on ensimmäinen ja tärkein vaihe histologisen näytteen valmistuksessa. Fiksoinnin tavoitteena on pysäyttää katabolisten entsyymien toiminta, minimoida liukoisten molekyylien diffuusio alkuperäisiltä paikoiltaan, estää mikro-organismien hajotustoiminta, pysäyttää autolyysi ja säilyttää makromolekyylinen rakenne mahdollisimman samankaltaisena kuin elävässä kudoksessa. Fiksoiminen perustuu pääasiassa kudosten proteiinien koaguloitumiseen, saostumiseen ja verkkoutumiseen. Mikään fiksaatiota seuraavista työvaiheista ei voi korjata fiksaation epäonnistumista.

(Eltoum – Fredenburgh – Myers - Grizzle 2001b: 173; Grizzle - Fredenburgh 2001: 183.)

Fiksoimisessa on kaksi päätapaa, fysikaalinen ja kemiallinen. Fysikaalisessa fiksaatiossa yleisin tapa on solukon nopea jäädyttäminen vähintään - 40 celsiusaste-

seen, jonka jälkeen näyte leikataan -20°C :ssa. Menetelmää käytetään, kun näyte on valmistettava nopeasti kuten biopsianäytteet. Fysikaalinen fiksaatio on hyvä menetelmä myös tietyissä histokemiallisissa ja immunosytokemiallisissa tutkimuksissa, joissa solun toiminnot täytyy pysäyttää nopeasti. Kemiallinen fiksoiminen voidaan suorittaa kahdella eri tavalla. Immersiokiinnityksessä kuolleesta tai elävästä organismista otettu näyte upotetaan heti fiksaatiiviin. Perfuusiokiinnityksessä fiksaatiivi pumpataan sydämeen tai aorttaan, josta se leviää verenkierron kapillaarien kautta kaikkiin elimistön soluihin. Kemiallinen fiksaatio on fysikaalista fiksaatiota huomattavasti hitaampi menetelmä. (Suomen virtuaali yliopisto solunetti. 2006.)

Monet tekijät vaikuttavat fiksointiprosessiin, näitä ovat: käytetty puskuri, fiksaatiivin kyky tunkeutua kudokseen, käytetyn fiksaatiivin tilavuus, lämpötila, konsentraatio ja fiksaatioaika. Fiksaatiossa paras lopputulos saadaan lähellä neutraalia pH:a. Liiallinen happamuus aiheuttaa formaliini-hemi pigmentin muodostumista, joka voidaan havaita mustana sakkana kudoksessa. Kudosten hypoksia alentaa pH:a, siksi fiksaatiivilla täytyy olla puskurointikapasiteettia liiallisen happamuuden estämiseksi. Yleisimpiä puskureita ovat fosfaatit ja bikarbonaatit. Jokaisella fiksaatiivilla on erilainen kyky tunkeutua kudokseen, formaliini tunkeutuu parhaiten ja glutaraldehydi huonoinen. Fiksaatiivien permeabiliteettikyky tulisikin ottaa huomioon fiksoitavien kudospalojen koossa. Myös fiksaatiivin tilavuus on tärkeää, suhteen pitäisi olla 10:1. Lämpötilan nostaminen nopeuttaa fiksaatiota, liian korkea fiksaatiivin konsentraatio taas saattaa vaikuttaa kudoksen rakenteeseen ja tuottaa artefaktoja. Kudos täytyisi saada fiksaatiiviin mahdollisimman nopeasti elimistöstä poistamisen jälkeen, sillä myös kudoksen kuivuminen aiheuttaa kudokseen artefaktoja. Lisäksi kudoksen hajoaminen alkaa välittömästi kudoksen poistamisen jälkeen, jolloin menetetään soluorganelleja ja tumat alkavat kutistua. (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.).

Fiksaatiivit perustuvat erilaisiin toimintamekanismeihin. Jokaisella fiksaatiivilla on hyötynsä ja haittansa. Haittoja ovat tiettyjen molekyylien menetys, kudosten turpoaminen tai kutistuminen sekä mahdolliset vaikutukset biokemiallisiin tai histokemiallisiin värjäyksiin. Fiksaatiivin tärkeitä ominaisuuksia on hematoksyliini-eosiini värjäyksen korkealaatuinen värjäytyvyys vielä pitkienkin aikojen kuluttua fiksoinnista. Fiksaatiivin täytyy pystyä estämään myös lyhyt- ja pitkäaikaista kudosten hajoamista. (El-toum – Fredenburgh – Myers - Grizzle 2001b: 173; Grizzle - Fredenburgh 2001:

183.) Kaikkeen sopivaa fiksaatiivia ei ole olemassa. Tavallisesti fiksaatiivi kiinnittää proteiinit, mutta ei kunnolla rasvoja ja sokereita. On myös tavallista, että tuma fiksoituu, mutta solulima jää fiksoitumatta. Käytännössä yhtäaikaan voidaan käyttää useita eri fiksaatiiveja, jotka täydentävät toisiaan. (Suomen virtuaali yliopisto solunetti. 2006.) Toimintamekanismiensa mukaan fiksaatiivit jaetaan viiteen pääluokkaan: aldehydit, elohopeat, alkoholit, hapettavat aineet ja pikraatit. Glutaraldehydi ja formaldehydi kuuluvat aldehydeihin (Fox – Johnson – Whiting – Roller 1985: 845; The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012).

Formaldehydi on kaasu, jota yleensä käsitellään 37 % tai 40 % vesiliuoksena. Formaldehydin vesiliuosta kutsutaan formaliiniksi. 10 % formaliini on yleisin fiksaatiivi, jota käytetään diagnostisessa patologiassa. Kaupallinen formaliini on fosfaattipuskuroitua. Formaldehydi muodostaa veden kanssa metyleenihydraattia, joka reagoi useiden proteiinien sivuketjujen kanssa muodostaen reaktiivisia hydroksimetyylisivuryhmiä. Formaldehydi reagoi myös nukleiinihappojen ja tumaproteiinien kanssa tunkeutumalla nukleiinihappojen ja proteiinien väliin stabiloiden ne ja reagoiden nukleotidien vapaiden aminoryhmien kanssa. Lisäksi formaldehydi reagoi myös tyydyttämättömien rasvahappojen hiilten välisten kaksoisidosten ja rikki-vetysidosten kanssa, hiilihyaattien kanssa formaldehydi ei kuitenkaan reagoi. Formaldehydi tunkeutuu kudokseen hyvin, mutta melko hitaalla nopeudella. (Fox – Johnson – Whiting – Roller 1985: 845; The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.)

Glutaraldehydi aiheuttaa proteiinien alfa-helix rakenteen uudelleen muodostumisen, se fiksoi nopeasti vaikkakin tunkeutuu kudokseen hitaasti (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012). Mekanismissa, jolla elohopeat fiksoivat ei tunneta. Elohopeafiksaatiivit sisältävät elohopeakloridia, joka tunkeutuu kudokseen suhteellisen huonosti ja aiheuttaa kudoksen kovettumista. Toisaalta nämä fiksaatiivit ovat nopeita ja tumat erottuvat hyvin.

Alkoholit kuten etanoli ja metanoli denaturoivat proteiineja eikä näitä käytetä juuriin kudosten fiksoinnissa, koska ne haurauttavat ja kovettavat. Alkoholifiksaatio toimii parhaiten sytologisille näytteille, lisäksi alkoholit säilyttävät hyvin tumien rakenteen. Hapettavat fiksaatiivit, kuten kaliumpermanganaatti aiheuttaa proteiinien välille ristsidoksia, mutta myös denaturoi niitä. Pikraatit ovat fiksaatiiviryhmä, joka

sisältää pikriinihappoa. Pikriinihapon toiminta mekanismeiksi fiksaatiivina ei tunneta. Sen ominaisuudet ovat verrattavissa elohopeafiksaatiivien ominaisuuksiin. (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.) Kudoksen fiksoimisen jälkeen tapahtuu kudoksen prosessointi, jonka tarkoituksena on poistaa kudoksesta vettä ja imeyttää kudokseen tukiainetta. Seuraavassa kappaleessa käyn läpi kudosprosessoinnin.

2.3 Kudosprosessointi

Kudosprosessoinnin tarkoitus on korvata kudoksen sisältämä vesi tukiaineella. Tukiaine kovettaa kudoksen, jolloin siitä on mahdollisuus leikata ohuita leikkeitä mikroskooppista tarkastelua varten. Kudosprosessointi käsittää yleensä kaksi vaihetta: dehydraation ja kirkastuksen. (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.)

Dehydraation tarkoituksena on poistaa kudoksessa oleva vesi, koska parafiini ei sekoitu veden kanssa. Dehydraatio tapahtuu nousevassa alkoholisarjassa ja poistaa samalla formaliinin. (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.) Kirkastusvaiheessa kudokseen imeytetään tukiaineen liuotin. Yleisimmin liuottimena käytetään ksyleeniä, joka sekoittuu sekä alkoholin että parafiinin kanssa. Ksyleenikäsittelyn aikana kudoksesta muuttuu myös läpinäkyväksi. Ksyleenikäsittelyn on oltava nopea, koska liian pitkä seisotus kutistaa kudosta ja muuttaa sen morfologiaa. (Bancroft 2002: 87.) Tukiaineena käytetään parafiinia. Parafiinivaha on sekoitus pitkäketjuisia hiilihydraatteja, jotka muodostuvat uuttaessa mineraaliöljyä. Sulamispiste vaihtelee 40 - 70 celsiusasteen välillä. Kudosprosessoinnin viimeisessä vaiheessa sulaa parafiini imeytetään kudokseen. Parafiini antaa kudospalalle tarvittavan tuen, jolloin kudoksen rakenne ei häiriinny mikrotomian aikana. (Bancroft - Gamble 2008: 87.)

HUSLAB:ssa kudosprosessointi tehdään automaation avulla. Automaatio toimii apuna, kun tutkittava näytemäärä on suuri. Automaatti siirtää kudokasetit liuoksesta toiseen asetetun ohjelman mukaisesti ja liikuttaa niitä tasaisesti. Tämän liikuttelun on todettu tehostavan aineiden imeytymistä kudoksiin tasaisemmin ja vähentävän kudosprosessointiin kuluvaa aikaa. Liikuttelun lisäksi kudosprosessorit käyttävät

hyväkseen lämpöä, joka tehostaa kudoksen prosessointia. (Bancroft - Gamble 2008: 88.)

HUSLAB:ssa on käytössä kaksi erilaista kudospesessoria, joista toinen käyttää prosessoinnissa apuna mikroaalloja ja vakuumia. Vakuumi tehostaa tukiaineen tunkeutumista kudokseen. Mikroaallot ovat elektromagneettisia aalloja, joiden aallonpituus 2,5 GHz:n taajuudella on 12,2 cm. Mikroaalloja säätelee sähköinen ja magneettinen kenttä. Sähkömagneettisen kentän äärimmäisen nopeat muutokset saavat aikaan dipolaaristen molekyylien kuten veden ja proteiinien värähtelyä akselien sa ympäri. Tämä värähtely johtaa lämmön syntymiseen, kun molekyylit alkavat törmäillä toisiinsa. Kun aine on sellainen, että se absorpoo mikroaallot, se jännittyy ja tuottaa lämpöä. (Boon – Kok 1987: 11; Talman – Hasselager 2008: 899.) Mikroaallojen käyttö kudospesessoinnissa, samoin kuin fiksaatossa, perustuu aineiden imeytymisen nopeuttamiseen ja kudospesessoinnin tehostumiseen (Boon – Kok 1987:11; Talman – Hasselager 2008:899; Rohr – Layfield – Wallin – Hardy 2001: 703). Seuraavassa kappaleessa kerron kahden erilaisia menetelmiä käyttävän kudospesessorin välisistä eroista.

2.3.1 Kudospesessoinnin erojen vaikutus histologiin konevärjäyksiin

HUSLABin keskuspatologia 1:n ja 2:n kudospesessointi eroavat toisistaan. Keskuspatologia 2:ssa kudokset prosessoidaan Sakuran Tissue-Tek Xpress:llä, joka käyttää kudoksen prosessoinnissa apuna myös mikroaalloja. Keskuspatologia 1:ssä pesessointi tapahtui perinteisemmällä menetelmällä, Thermo Shandon Pathcentre-laitteella. Sakuran valmistama laite on tarkka kudospalojen paksuudesta, ne saavat olla vain 1.5 – 2.5 mm paksuja, Thermon laitteella tällaista rajoitusta ei ole. Thermon laitteella kudosten pesessointi vie huomattavasti enemmän aikaa verrattuna Sakuran laitteeseen. Kahden laitteen väliset toimintaerot kudoksen prosessoinnissa voivat aiheuttaa eroja värjäystulokseen. Tätä eroa selvittääkseni, pesessoin jokaisesta kuutta tutkimaani kudosta kahdella eri kudospesessorilla. Jokaisesta kuudesta tutkittavasta kudoksesta valmistettiin 3 µm paksuiset leikkeet, jotka värjättiin histologisilla perusvärjäyksillä HE, PAS, AB-PAS, Herovici ja Giemsa.

Kudoksen pesessoinnin jälkeen kudospalat valetaan parafiinimuottiin ja ne leikataan leikkeiksi. Leikkeet asetellaan objektilasille odottamaan värjäystä. Seuraavissa

kahdessa kappaleessa esittelen parafiinileikkeiden valmistamisen ja leikepaksuuden vaikutukset mikroskooppiseen tarkasteluun.

2.4 Valu parafiiniin ja mikrotomia

Parafiinileikkeitä käytetään monenlaisiin histologismorfologisiin tutkimuksiin. Etuna on, että kudoksista voidaan helposti valmistaa pitkiä ja jatkuvia leikesarjoja. Valittavana on suuri määrä erilaisia fiksointi- ja värjäysmenetelmiä. Ennen leikkeiden leikkaamista, kudospala valetaan parafiiniin metallisen muotin avulla. Näytepala asetetaan tiiviisti muotin pohjalle, päälle kaadetaan sulaa parafiinia ja muotin päälle asetetaan kudosprosessoinnissa käytetty muovikasetti. Parafiinin annetaan jäähmettyä, jonka jälkeen muodostunut kudosplokki trimmataan. Trimmaamisen tarkoituksena on poistaa ylimääräinen parafiini edustavien leikkeiden aikaansaamiseksi. Valmiista trimmatusta blokista leikataan noin 3 µm paksuisia leikkeitä mikrotomin avulla. Leikkeet siirretään objektilaseille vesihauteen ja pensseleiden avulla. Valmiit objektilasit asetetaan lämpölelylle, joka on parafiinin sulamispisteen lämpöinen. (Bancroft - Gamble 2008: 95; HUSLABin työohje 2012; The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.)

Mikrotomian tarkoituksena on saattaa kudokset sellaiseen muotoon, että niitä voidaan tarkastella mikroskoopilla. Leikkeiden onnistumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat kudoksen laatu, terän asento ja kunto, leikkausnopeus, lämpötila ja ilmankosteus. Leikkaamista haittaa usein leikkeisiin muodostuva staattinen sähkövaraus. (Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 18.) Seuraavassa kappaleessa kerron hieman leikepaksuuden vaikutuksesta histologiseen värjäystulokseen.

2.4.1 Leikepaksuuden vaikutus histologiseen värjäystulokseen

Kudosleikkeen paksuus vaikuttaa lopputulokseen. Paksu leike imee itseensä enemmän väriä. Mikroskooppisessa tarkastelussa paksusta leikkeestä on vaikea erottaa kudoksen rakennetta tai vaikkapa solujen tumien kromatiinirakennetta, johtuen liian monesta päällekkäisestä solukerroksesta (Haastattelu: Kirsi Eberhardt 15.7.2012). Tässä työssä kaikki kontrollileikkeet olivat 3 µm paksuisia. Jotta leikepaksuuden vaikutuksia voitaisiin vertailla, jokaisesta kudoksesta leikattiin myös 8

µm paksuisia leikkeitä. Kun leikkeet on saatu objektilasille, objektilasit värjätään. Seuraavissa kappaleissa syvennyn erillisiin värjäysmenetelmiin.

2.5 Väriaineista ja värjäysmenetelmistä

Kun tutkittavat kudokset on saatu objektilasille, ne värjätään histologisilla värjäyksillä. Histologisten värjäysten tarkoituksena on saada esiin kudoksen rakenteita. Eri-laiset histologiset värjäykset värjäävät kudoksista erilaisia rakenteita ja molekyyliä. Seuraavissa kappaleissa esittelen viiden histologisen perusvärjäyksen teoriaa. Värjäykset ovat Hematoksyliini-eosiini-värjäys, Periodic Acid Schiff, Alcian Blue - Periodic Acid Schiff, Herovici ja Giemsa.

Histologissa värjäyksissä voidaan käyttää yhtä tai useampaa väriä yhdistelmänä tai peräkkäin käytettynä. Histologiset värjäymekanismit ovat monimutkaisia ja niiden tarkasta kemiasta tiedetään melko vähän. Käytetyistä väriaineista useimmat ovat aromaattisia yhdisteitä. Ne sisältävät bentseenirenkaaseen sitoutuneen väriä antavan ryhmän, kromoforin ja toisen ionisoituvan ryhmän, auksokromin jonka avulla yhdiste pystyy sitoutumaan värjättävään kudokseen. Auksokromeista tärkeimmät ovat kationinen NH_2 - ja anioniset OH - ja COOH -ryhmät. (Londesborough – Pekkari-nen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 22.)

Suurin osa väriaineista sitoutuu kohdekudokseen sähkövarauksien avulla, mutta myös vetysidoksia, Van der Waalsin voimia ja kovalenttisiä sidoksia hyväksi käyttäen. Sähköisiä voimia hyväksikäyttävän väriaineen tapauksessa sitoutuneen värin määrä riippuu värin sähköisestä varauksista ja niiden voimakkuuksista. Osa värjäyksistä perustuu siihen, että väriaine itsessään ei ole värillinen, mutta reagoi värjättävän kudoksen kanssa ja muodostunut yhdiste on värillinen. Joissakin tapauksissa, kuten lipideillä, värjäytyminen perustuu väriaineen liukenemiseen tiettyyn kudoksen aineosaan. (Prento 2001: 137; Bancroft – Gamble 2008: 105.) Värjäykseen vaikuttavat myös kudoksen tiheys, PH, väriliuoksen ionivahvuus, väriliuoksen vahvuus, värin rakenne, kudosten fiksointi, lämpötila, väriaineen diffuusionopeus ja tiheys. (Prento 2001:137; Bancroft – Gamble 2008:105.)

Perinteisesti puhutaan happamista ja emäksisistä väreistä, mutta kyse ei ole suoraan hapoista tai emäksistä vaan värit ovat orgaanisia yhdisteitä, joissa on useita

ionisoituvia ryhmiä. Hapan väri on anioninen eli sillä on negatiivinen nettovaraus ja se sitoutuu positiivisesti varautuneihin kudokskappaleisiin. Hapanta väriä itseensä sitovan kudoksen sanotaan olevan asidofiilinen. Emäksinen väri on kationinen, eli sillä on siis positiivinen nettovaraus ja se sitoutuu kudoksen negatiivisesti varautuneisiin ryhmiin. Kudosta, joka sitoo emäksistä väriä kutsutaan basofiiliseksi. Muuttamalla värjäyksen pH:ta voidaan vaikuttaa värjäyksen lopputulokseen. Negatiivisesti varautuneella väriaineella on suurin teho happamassa liuoksessa, koska suurimmalla osalla kudoksen proteineista on silloin positiivinen nettovaraus. Sama pätee myös emäksisille väriaineille. (Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 22.) Seuraavissa kappaleissa esittelen viisi erilaista histologista perusvärjäystä ja niihin liittyviä virhelähteitä.

2.5.1 Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Hematoksyliini-eosiini-värjäys (HE) on yleisin perusvärjäysmenetelmä. Värjäystä käytetään etenkin kliinisissä ja patologisissa tutkimuksissa. Hematoksyliini uutetaan kuumalla vedellä *Haematoxylon campechianum* nimisestä puusta. Väri saostetaan liuoksesta urean avulla. Hematoksyliini itsessään ei ole väriaine, vaan hematoksyliinin hapetettu muoto, hemateiini toimii värinä. Tässä työssä käytetään kemiallisella hapettamisella aikaan saatua Mayerin hematoksyliiniä. Kemiallisen hapettamisen etuna on, että hematoksyliini liuos on käyttövalmis heti valmistamisen jälkeen. Kemiallisesti hapetettujen hematoksyliinien käyttöaika on kuitenkin lyhempi verrattuna luonnollisesti esim. valon ja ilman kanssa hapetettuihin hematoksyliineihin. Hemateiini on anioninen, sillä on huono affiniteetti kudokseen ja se on riittämätön tumien värjäämiseen ilman peittäusainetta. Parhaat peittäusaineet hematoksyliinille ovat mm. alumiinin suolat, rauta tai lyijy. Metallinen peittäusaine muuttaa värin positiivisen nettovarauksen, joka mahdollistaa hematoksyliinin sitoutumisen anioniin kohteisiin kuten tuman kromatiini. Hematoksyliinilioukset luokitellaan peittäusaineiden mukaan. Mayerin hematoksyliinissä käytetään peittäusaineena alumiinia. Peittäusaine on yleensä alumiinikaliumsulfaattia tai alumiiniammoniunsulfaattia ja kypsytyys tapahtuu natriumiodaatilla. Hematoksyliini värjää tumat ensin punaisiksi, tumat muuttuvat edelleen mustansinisiksi kun leikkeet pestään heikosti alkaalisella liuoksella. Yleensä hanavesi on tähän takoitukseen tarpeeksi alkaalista. Hematoksyliinin ongelma tumavärinä on, että se on hyvin herkkä lisätyille happamille värjäysliuoksille. (Bancroft – Gamble 2008: 121.)

Hematoksyliinivärjäystä käytettäessä, eosini on paras väri kun halutaan esille kudoksen rakenne. Emäksisiin ryhmiin, kuten proteiinien histidiiniin, lysiniin ja arginiiniin sitoutunut eosini on hapan ksantiiniväri. Eosini tunkeutuu hyvin tiheisiin ja löyhiin kudusrakenteisiin värjäten nämä punaisen eri sävyillä. (Bancroft - Gamble 2008: 121.) Eosini on dissosioituneena melko laajalla PH-alueella, ainoastaan hyvin happamassa (< pH 4) se on varauksettomassa muodossa ja tarttuu kudokseen epäspesifisesti. Kudospoteinien nettovaraus on positiivinen kun pH on alle 6. Sytoplasmian proteiinien värjäämiseen käytettävä pH-väli on siis noin 4-6. (Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 22.)

2.5.2 Periodic Acid Schiff

Periodic Acid Schiff eli lyhemmin PAS-värjäys on yksi tärkeistä värjäysmenetelmistä patologian laboratoriossa. PAS-värjäyksellä pyritään osoittamaan hiilihydraatteja, tarkennettuna neutraaleja polysakkarideja kuten glykogeeni, tärkkelys, selluloosa ja kitiini. Värjästekniikka auttaa tuumoreiden diagnosoinnissa paljastaen musiinit ja glykogeenin. PAS-värjäys on myös herkkä kudoksessa elävien sienten ilmentämisessä. (Bancroft – Gamle 2008: 168.)

Hiilihydraatteihin kuuluvat sokerit, tärkkelys, selluloosa ja proteineihin liittyvät polymeerit, jotka luokitellaan mono-, oligo- ja polysakkarideihin. Glukoosi on ainoa monosakkaridi, jota voi löytyä kudoksista. Pienen kokonsa ja suuren vesiliukoisuutensa vuoksi se on kuitenkin mahdoton osoittaa, tämän vuoksi kudoksista värjätään yleensä PAS-värjäyksellä glukoosin varastomuotoa, glykogeenia. Glykogeenia on maksassa ja poikkijuovaisessa lihaskudoksessa. Loput osoitettavat hiilihydraatit ovat sitoutuneina joko proteineihin tai lipideihin. (Bancroft – Gamle 2008: 168.)

Värjäyksessä käytettävä Schiffin reagenssi paljastaa memebraanien paksuuden ja on hyödyllinen indikaattori esimerkiksi munuaisen memebraanien paksuuntumisessa. Hiilihydraateilla, aminohapoilla, proteineilla ja steroideilla esiintyy sisäisiä glykoli-ryhmiä tai näiden amino- tai alkylaminojohdannaisia. Värjäyksessä käytettävä perijodihappo hapettaa nämä 1,2 glykolien tai niiden amino ja alkyylijohdannaisen hiilihiili-sidokset, jolloin muodostuu dialdehydejä. Dialdehydit voivat puolestaan muodostaa liukenemattoman, punaisen värikompleksin Schiffin reagenssin kanssa, joka

sisältää emäksistä fuksiinia, natriummetabisulfiittia ja suolahappoa. Reaktio-tuote on voimakkaan punainen ja värin intensiteetti on riippuvainen kudoksen glykolikon-konentraatiosta. Maksan glykogeeni värjäytyy purppuranpunaiseksi, paksusuolen kryptat, tyvikalvot ja Kupfferin solujen sytoplasmat maksassa värjäytyvät punaiseksi. (Bancroft – Gamle 2008: 168; Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 22; Putchtler – Meloan – Brewton 1974; Labquality. 2010.)

Monosakkaridit, joilta puuttuu glykolit tai jotka sisältävät hydroksyyliiryhmiä eivät värjäydy PAS-värjäyksellä. Nukleinihappojen glykoliryhmistä yksi on substituoitu, joten ne eivät värjäydy PAS-reaktiolla. PAS-reaktio ei ole spesifinen hiilihydraateille, joten varmistuksena käytetään bentsosyolaatiota tai asetylaatiota. Jos tutkittava aine on PAS-positiivinen normaalisti ja negatiivinen edellä mainittujen käsittelyjen jälkeen, on kyseessä polysakkaridi. (Bancroft – Gamle 2008: 168; Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 22; Putchtler – Meloan – Brewton 1974.)

2.5.3 Alcian Blue -Periodic Acid Schiff

Alcian Blue-Periodic Acid Schiff, lyhyemmin AB-PAS-värjäys on yksi yleisesti histologiassa käytetyistä värjäysmenetelmistä. AB-PAS erottelee happamat ja neutraalit lima-aineet. Happamat lima-aineet reagoivat Alcian Blue-värjäyksessä eivätkä enää reagoi PAS-värjäykseen. (Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 32.) Useimmissa värjäysprotokollissa kudokset värjätään ensin alsianin sinisellä ja vasta sen jälkeen PAS-tekniikalla (Bancroft – Gamle 2008: 172).

Alsianin sininen on suuri konjugoitunut värimolekyyli, jota on aikaisemmin käytetty tekstiilivärinä. Molekyyli muodostuu kuparia sisältävästä pthalosyaniini renkaasta, johon liittyy neljä isothiouroniryhmää. Isothiouroniryhmät ovat melko vahvoja emäksiä. Mekanismi, jolla alsianin sininen värjää hiilihydraatteja on edelleen melko tuntematon. Kuitenkin uskotaan, että kationiset isothiouroniryhmät sitoutuvat elektrostaattisilla sidoksilla kudoksiin. (Scott – Quintarelli - Dellovo 1964: 73.)

Scottin ym. (1995) mukaan monien värien sitoutuminen DNA:n johtuu niiden kyvystä tunkeutua DNA:n kaksoisheliksiin sisälle. Alsianinsininen ei kuitenkaan pääse tunkeutumaan DNA-juosteiden väliin johtuen värin suurista tetrametyyli-isothiouroniryhmistään. Koska alsianin sininen väri ei mahdu juosteiden väliin, se

”näkee” vain negatiivisesti varautuneet fosfaattiesteriryhmät DNA-juosteiden ulkopuolella ja sitoutuminen on puhtaasti elektrostaattista. Sitoutumiseen tarvittavien varausten menettäminen vähentää värin sitoutumista ja siksi kationit, kuten Mg korvaa helposti alsianin sinisen värin. (Scott – Quintarelli - Dellovo 1964: 73.)

Alsianin sininen sitoutuu ja saostuu hyaluriinihappoihin, kondroitiinisulfaattiin ja hepariiniin. Sulfaatti ja karboksylaattiryhmät ionisoituvat alhaisessa pH:ssa 2,5 ja ovat siis negatiivisesti varautuneita. Myös happamat epiteeliperäiset musiinit reagoivat samassa pH:ssa alsianin siniseen väriin. Happamat mukopolysakkaridit ovat polymeerejä, jotka sisältävät happaman ryhmän kuten glukuroni-, galakturoni- tai rikkihapon. Happamia mukopolysakkarideja on mm. rustossa, luussa, jänteissä, ihossa ja syljessä. Happamat mukopolysakkaridit eivät yleensä osoita PAS-positiivisia reaktioita, koska glykoliryhmä on sitoutunut sulfaatilla. Tämän vuoksi ne osoitetaan al-cian blue –värjäyksellä, jossa positiiviset ryhmät reagoivat polyanionien (happamien limojen) karboksyyli- ja sulfaattiryhmien kanssa. (Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 32.)

2.5.4 Herovici

Herovici-värjäys on yksi HUSLAB:n viidestä histologisesta perusvärjäyksestä. Herovici-värjäyksellä kyetään erottamaan toisistaan erilaisia tukikudoksia. Herovici-värjäystä voidaan kutsua ”trikromivärjäykseksi”. Menetelmässä on kolme väriä, joista yksi on tumaväri. Menetelmän tarkoituksena on erottaa kollageeni ja lihasäikeet.

Aniliininsininen tai pikrometyylisininen ja hapan pikrofuksiini yhdistelmänä muodostavat Herovici-värjäyksen. Herovici värjää kypsän tiheän kollageenin punaiseksi kun taas nuoren, vasta muodostuneen kollageenin siniseksi. Esimerkiksi sikiön kollageeni tai haavojen parantumisen yhteydessä muodostuva kollageeni värjäytyvät siniseksi kun taas gastriset submukoosiset kollageenit värjäytyvät punaiseksi. Kollageenin denaturaatio 2 N-3 N etikkahapolla tai happamalla vedellä (pH 4) 95 celsiusasteeseen fragmentoi punaisen kollageenin ja siirtää värjäysreaktiota kohti sinistä väriä. Renaalinen ja gastrinen retikulumi sekä subepidermaalinen kollageeni kestää paremmin tätä käsittelyä kuin karkea kollageeni ja ne säilyvät siksi punaisina. (Lillie – Tracy – Pizzoloto – Donaldson - Reynolds 1980: 153.)

Värjäyksessä käytettävästä pikriinihaposta ja happofuksiinista valmistettavaa pikropolykromiliuosta kutsutaan myös toisella nimellä: Van Giesonin-liuos. Van Giesonin liuos värjää kollageenin punaiseksi, sytoplasmat keltaisiksi ja tumat mustiksi. (Stainsfile: Van Gieson for collagen. 2012.) Suurimolekyylisenä aineena happofuksiini tunkeutuu vain löyhään sidekudokseen kun taas pienimolekyylinen pikriinihappo tunkeutuu tiiviisiin kudoksiin (Ellis 2012).

Herovici-värjäyksessä tumat värjätään Weigertin hematoksyliinillä mustiksi (Stainsfile: Weigerts iron hematoxylin. 2012). Weigertin hematoksyliini kuuluu rautahematoksyliineihin, joissa peitta-aineena käytetään rautayhdisteitä jotka hapettavat hematoksyliinin hemateiiniksi (Avwioro 2011). Värjäyksessä käytettävällä hematoksyliinin väriaineella, hemateiinilla on huono kudosaaffiniteetti. Huonon kudosaaffiniteetin vuoksi värjäyksessä käytettävä Van Giesonin liuos poistaa suurimman osan hematoksyliinista ja värjäystulos jää vaaleaksi. Vaalean värjäystuloksen estämiseksi värjäyksessä käytetään Weigertin hematoksyliiniä, jossa on peitta-aineena alumiinin sijasta rautakloridia. Peitta-aineen avulla kationinen hemateiini sitoutuu happamiin kudskomponentteihin, erityisesti nukleinihappoihin ja Van Giesonin liuoksen pikriinihappo ei vaalenna tumaväriä. (Quintero-Hunter – Grier – Muscato 1991:169, Bancroft – Gamle 2008: 124.) Pitkä säilytysaika aiheuttaa hematoksyliinin ylihapettumista ja tämän vuoksi rautahematoksyliinit tulisi valmistaa juuri ennen käyttöä. Hematoksyliinin vesiliuos täytyy kuitenkin valmistaa 4-6 viikkoa aikaisemmin, että liuos ehtisi hapettua ja kypsyä kunnolla. Hematoksyliini ja rautapitoinen liuos yhdistetään Weigertin hematoksyliiniliuokseksi juuri ennen käyttöä. (Avwioro 2011.) Herovici-värjäyksessä käytettävä Metanol yellow, toimii sytoplasmisena vastavärinä ja värjää esimerkiksi punasolut keltaiseksi. (Quintero-Hunter – Grier – Muscato 1991: 169, Stainsfile: metanil yellow. 2012.)

2.5.5 Giemsa

Giemsa-värjäys suunniteltiin malariaparasitiittien havainnollistamiseksi, menetelmä nimettiin Gustav Giemsan mukaan, joka oli aikansa uranuurtaja lääke- ja mikrobiologisessa tutkimuksessa. (Barcia 2007.) Nykyään Giemsa-värjäystä käytetään histopatologiassa mm. malarian, helikobakteerien ja parasitiittien diagnosoimiseen (HUS-LAB, ohjekirja, gastrokopianäytteiden tutkiminen. 2012.). Giemsa-värjäys otettiin

käyttöön histopatologiassa sen korkealaatuisen värjäystuloksen vuoksi. Giemsa-värjäys värjää tumatukelmukset ja kromatiinin sekä paljastaa solukomponenttien metakromasian. (Barcia 2007.) Värjäys on spesifinen DNA:n fosfaattiryhmille ja sitoutuu alueille, joilla on paljon adeniini-tyymiini sidoksia (Ellis 2012.). Värjäyksen tiedetään paljastavan esimerkiksi haiman ja gonadien tarkan rakenteen (Barcia 2007).

Alkuperäisessä kudosten Giemsa-värjäyksessä kudokset käsiteltiin jodidilla ja hyposulfiittiliuoksella, jonka jälkeen tapahtui huuhtelu tislatusella vedellä ja värjäys giemsaliliuoksella. Työnsä aikana G. Giemsa kehitti "salaisen" metyleenisinisen hapettimen, joka nimettiin Azuuri I:ksi. Azuuri I koostuu Azuuri A:n ja B:n sekoituksesta, jotka ovat metyleenisinisen variantteja. Myöhemmin Giemsa yhdisti Azuuri I:n eosiniin kanssa. (Barcia 2007.) Kaikki giemsavärit sisältävät metyleeni sinistä, thiazinivärejä ja eosinia. Solujen tumien tyypillinen väri johtuu eosiniin, azuuri B:n ja DNA:n muodostamasta kompleksista. Väriin intensiteetti riippuu azuuri B:n määrästä sekä azuuri B:n ja eosini Y:n suhteesta. Värjäystulokseen vaikuttavat myös puskurin pH, käytetty puskuuri, kudoksen fiksaatio ja värjäysaika. (Wolf – Kuhlman 2006: 1.) Giemsa-väri on erittäin vaikea valmistaa, HUSLAB:n keskuspatologian käytössä onkin Merckin valmistama valmis giemsaliliuos. Kyseinen liuos sisältää Azure B:ä, Metyleeni sinistä ja eosini Y:ä. Kudosten värjäystulos voi vaihdella johtuen värjäytyvien kudosten komponenttien määrästä, tämän vuoksi värjäyksen täytyy kestää tarpeeksi kauan. Paras värjäystulos aikaan saadaan laimealla värjäysliuoksella ja pitkällä inkubaatioajalla. Värjäyksessä tapahtuva differentiaatio saadaan aikaan laimealla etikkahapolla ja etanolilla, etikkahappo poistaa ylimääräisen sinisen värin ja etanoli ylimääräisen eosiniin. (Wolf – Kuhlman 2006: 1.) Edellä mainittuihin viiteen eri histologiseen konevärjäykseen liittyy myös virhelähteitä, joista yleisimmät esittelen seuraavissa kappaleissa.

2.6 Konevärjäysten virhelähteet

Vaikka histologisten värjäysten koneellistamisessa pyritäänkin työn tehostamiseen lisäksi myös minimoimaan virheiden määrää, myös koneellisiin värjäyksiin liittyy virhelähteiden mahdollisuus. Tässä kappaleessa läpikäydään edellä mainittuihin yleisimpiin histologisiin konevärjäyksiin liittyviä virhelähteitä. Virhelähteet on koottu HUSLABin keskuspatologian laboratorioissa tekemiäni haastattelujeni perusteella.

2.6.1 Koneellisen HE-värjäyksen virhelähteet

Haastattelujeni mukaan koneellisessa HE-värjäyksessä yleisimmin tapahtuva virhe on vesihanan avaamisen unohtaminen. Muita virhelähteitä ovat suolahappokäsittelyyn tarvittavan liuksen valmistaminen väärin. Tässä työssä käytimme liian vahvaa suolahappoa. Lisäksi esimerkiksi sähkökatkoksesta tai värjäyskoneen epäkuuntoon menemisestä voi seurata värjättävien lasien liian pitkä differointi etanolissa. (Haastattelu: Kirsi Eberhardt 15.7.2012.)

2.6.2 Koneellisen PAS-värjäyksen virhelähteet

Haastattelujeni mukaan koneellisessa PAS-värjäyksessä mahdollisesti tapahtuvia virhelähteitä ovat vesihanan avaamisen unohtaminen, Schiffin reagenssin tai perjodihapon vanheneminen (Haastattelu: Kirsi Eberhardt 15.7.2012). Schiffin reagenssin toimivuus varmistetaan päivittäin tiputtamalla pisara reagenssia koeputkeen, jossa on puhdasta formaliinia. Tuloksena on hyvin voimakkaan aniliininpunainen liuos (HUSLABin konevärjäysten työohjeet. 2012). Reagenssin toimivuuden testaamista ei kuitenkaan kirjata huoltotoimenpidetaulukkoon vaan testaaminen on työpisteen työntekijän vastuulla. HUSLABin patologian konevärjäysten työohjeiden mukaan perjodihappo vaihdetaan viikon välein. Jos perjodihappo unohdetaan vaihtaa, vanha ja toimimaton perjodihappo voi muuttaa värjäystulosta.

2.6.3 Koneellisen AB-PAS-värjäyksen virhelähteet

Haastattelujeni mukaan koneellisessa AB-PAS-värjäyksessä mahdollisesti tapahtuvia virhelähteitä ovat vesihanan avaamisen unohtaminen, Schiffin reagenssin tai perjodihapon vanheneminen. (Haastattelu: Kirsi Eberhardt 15.7.2012.) Myös AB-PAS-värjäyksessä Schiffin reagenssin toimivuus varmistetaan päivittäin. Reagenssin toimivuus varmistetaan tiputtamalla pisara Schiffin reagenssia koeputkeen, jossa on puhdasta formaliinia. Tuloksena on hyvin voimakkaan aniliininpunainen liuos. Reagenssin toimivuuden testaamista ei kuitenkaan kirjata huoltotoimenpidetaulukkoon vaan testaaminen on työpisteen työntekijän vastuulla. HUSLABin patologian konevärjäysten työohjeiden mukaan perjodihappo vaihdetaan viikon välein. Jos perjodi-

happo unohdetaan vaihtaa, vanha ja toimimaton perjodihappo voi muuttaa värjäystulosta.

2.6.4 Koneellisen Herovici-värjäyksen virhelähteet

Haastattelujeni perusteella valitsin tähän työhön neljä erilaista Herovici-värjäyksessä mahdollisesti tapahtuvaa konevärjäyksen virhelähdettä. Yleisin koneellisessa Herovici-värjäyksessä mahdollisesti tapahtuva virhelähde on vesihanan avaamisen unohtaminen (Haastattelu: Kirsi Eberhardt 15.7.2012). HUSLABin työohjeen mukaan Weigertin hematoksyliiniliuosta täytyy kypsyttää auringonvalossa happekaissa olosuhteissa yhden kuukauden ajan (HUSLABin konevärjäysten työohjeet. 2012). Liian lyhyt kypsymisaika saattaa vaikuttaa värjäystulokseen. Muita virhelähteitä ovat metanil yellown toimimattomuus ja liian laimea pikropolykromiliuos. (Haastattelu: Kirsi Eberhardt 15.7.2012.) Pikropolykromiliuos koostuu pikrokromi ja fuksiiniliuoksista. HUSLABin keskuspatologian laboratorio tilaa pikropolykromiliuksen HUS:n liuoslaboratoriosta. Liian laimean pikropolykromiliuksen seuraukset värjäykseen saatiin aikaan laimentamalla pikropolykromiliuosta fuksiiniliuoksella.

2.6.5 Koneellisen Giemsa-värjäyksen virhelähteet

HUSLABissa Giemsa-värjäyksistä huolehtii keskuspatologia 2. Giemsavärjäystä käytetään pääasiallisesti helikobakteeriosoituksissa. Tämän vuoksi Giemsavärjäys tehtiin tässä työssä vain vatsakudoksesta, josta helikobakteeri voidaan osoittaa. Virhelähteitä selvittäessäni selvisi, että Giemsavärjäysautomaatin vesihana on pääsääntöisesti aina auki. Haastattelujeni mukaan Giemsa-värjäyksen mahdollinen virhelähde voisi kuitenkin olla vesihanan avaamisen unohtaminen (Haastattelu: Sanna Aakko. 13.7.2012). Tällainen tilanne voisi syntyä esimerkiksi laitehuollon yhteydessä, jos huoltomies sulkee hanan huollon ajaksi. Muita virhelähteitä voisivat olla koneen rikkoutumisesta johtuva etanolissa tapahtuvan differointiajan pidentyminen ja giemsaliuoksen vanheneminen. HUSLABin työohjeiden mukaan giemsaliuos vaihdetaan päivittäin sen nopean hapettumisen vuoksi (Haastattelu: Sanna Aakko. 13.7.2012; HUSLABin konevärjäysten työohje. 2012).

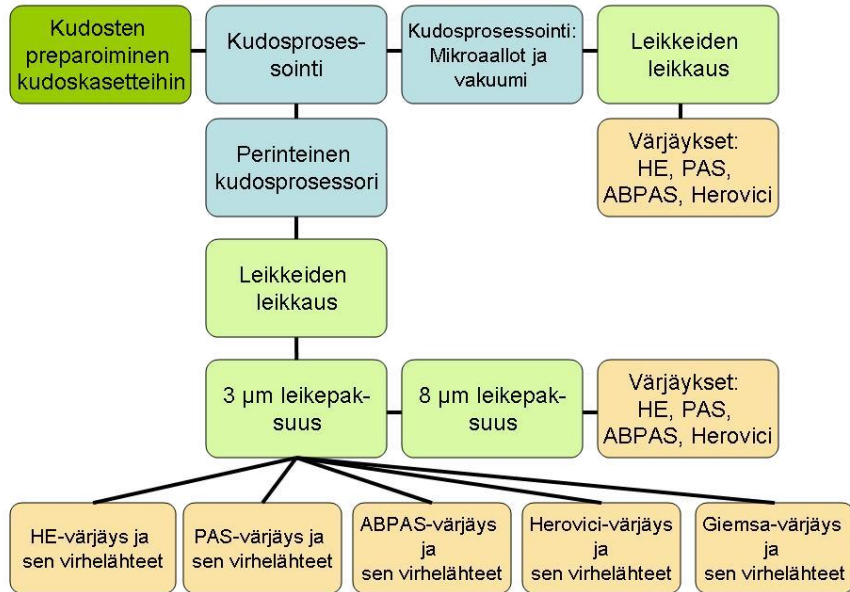
2.7 Objektilasien peittäminen

Värjätyt objektilaseille kiinnitetyt kudokset täytyy päällystää ohuella muovilla tai lasilla. Peittämisen vuoksi kudokset eivät naarmuunnu, niitä on helpompi tarkastella mikroskoopilla ja ne säilyvät kunnollisina vuosien ajan. HUSLAB:ssa käytettävät peittelykoneet käyttävät peittelyyn muovifilmiä, jossa on hartsia. Hartsit liukenee ksyleenin vaikutuksesta ja näin peitinkalvo liimautuu objektilasin pintaan. Kudosvärit ovat vesiliukoisia ja siksi värjätty objektilasi onkin vietävä alkoholisarjan kautta ksyleeniin veden poistamiseksi. Ksyleenin tehtävä on kirkastaa objektilasi ja kiinnittää muovifilmi objektilasin päälle. (The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. 2012.) Seuraavassa kappaleessa esittelen opetusmateriaaliin liittyvät tutkimustehtävät, joihin pyrin tämän opinnäytetyön avulla vastaamaan.

2.8 Tutkimustehtävät

Tässä kappaleessa esittelen tekemäni työn tutkimustehtävät ja tutkimusprosessin etenemisen. Tämän työn tarkoituksena on aikaansaada opetusmateriaali histologisen prosessin yleisimmistä värjäysvirhelähteistä HUSLABin patologian osaston ja Metropolia ammattikorkeakoulun käyttöön. Kontrollina toimivat ”ideaalit” värjäykset. Näytteinä käytettiin yleisimpiä HUSLABin patologian osastolle saapuvia kudoksia, joita ovat suoli, vatsa, kohtu, maksa, munuainen ja iho. Tutkittavat kudokset oli fiksoitu formaliinissa. Kuviossa 1. esitetään tutkimusprosessin eteneminen kudoksen preparoimisesta histologisiin värjäyksiin ja virhelähteisiin. Tutkimustehtävät, joihin valmistamani oppimateriaali antaa vastauksen:

1. Koneellisen HE-värjäyksen yleisimmät virhelähteet
2. Koneellisen PAS-värjäyksen yleisimmät virhelähteet
3. Koneellisen AB-PAS-värjäyksen yleisimmät virhelähteet
4. Koneellisen Herovici-värjäyksen yleisimmät virhelähteet
5. Koneellisen Giemsa-värjäyksen yleisimmät virhelähteet
6. Kahden erilaisen kudosprosessorin vaikutukset yllä mainituissa histologissa värjäyksissä
7. Leikepaksuuden vaikutus kudoksen värjäytyvyyteen



Kuvio 1. Tutkimusprosessin eteneminen.

3 Materiaalit ja menetelmät

Tässä kappaleessa luetellaan työssä käytetyt reagenssit ja niiden valmistajat sekä värjäyksissä käytetyt kanta- ja käyttöliuokset. Kappaleessa käydään läpi käytetyt menetelmät kudoksen prosessoinnista leikkeiden leikkaamiseen ja värjäykseen saakka.

3.1 Reagenssit

HUSLAB:n keskuslaboratorio tilaa tarvitsemansa reagenssit ja kantaliuokset kaupallisilta yrityksiltä tai HUS:n ylläpitämältä liuoslaboratoriolta. Liitteessä 1. on taulukko käyttämistäni reagensseista ja niiden hankintapaikoista. Liitteestä 2 löytyy taulukko käytettyihin värjäyksiin tarvituista kanta- ja käyttöliuoksista.

3.2 Kudokset, niiden käsittely, valaminen ja leikkaaminen leikkeiksi

Työssä käytettiin yleisimpiä HUSLABin patologian osastolle saapuvia kudoksia, joita ovat suoli, vatsa, kohtu, maksa, munuainen, iho. Näytteet otettiin hävitettävien kudosten terveistä osista. Kudosprosessointi tehtiin joko Thermon Shandon Pathcentre tai Sakuran Tissue-Tek Xpress x120 kudosprosessorilla (Kuvio 2). Käsittelyn jäl-

keen näytteet valettiin parafiiniin. Näytteistä tehtiin parafiinileikkeitä Thermo Scientificin microm 355S vesiliukumikrotomilla, jossa oli cool cut-kylmäblokki säätelemässä parafiiniblokin lämpötilaa. Kontrollileikkeet leikattiin nopeudella 20 ja leikkeiden paksuus oli 3 μm . Valmiit leikkeet nostettiin pensselin avulla objektilaseille ja nostettiin lämpölevylle. Kudosleikkeen paksuus vaikuttaa lopputulokseen. Tässä työssä kaikki kontrollileikkeet ovat 3 μm paksuisia. Jotta leikepaksuutta voitaisiin vertailla, leikkasin jokaisesta kudoksesta myös 8 μm paksuisia leikkeitä. Leikkeet värjättiin värjäysautomaateilla histologisilla perusvärjäyksillä.



Kuvio 2. a) Sakuran Tissue-Tek Xpress x120 kudosprosessori (Sakura.2013). b) Thermo Shandon Pathcente (UK Labs Direct. 2013).

3.3 Histologiset konevärjäykset

HUSLABin keskuspatologian laboratoriossa käytetään viittä koneellista perusvärjäystä. Nämä perusvärjäykset ovat: HE, PAS, ABPAS, Herovici ja Giemsa. Tässä kappaleessa esitellään viiden erilaisen histologisen konevärjäyksen suoritus.

3.3.1 HE-värjäyksen suoritus

HE-värjäys suoritettiin Sakura Tissue-Tek PRISMA laitteella. Kontrollikudosten värjäykseen käytettiin HUSLABin värjäysprotokollaa (Liite 1.). Ksyleenikäsittelyn jälleen

lasit peiteltiin Tissue-Tekin film laitteella. Koneellisten HE-värjäysten virhelähteet tehtiin Sakura Tissue-Tek PRISMA laitteella (Kuvio 3).



Kuvio 3. Sakuran Tissue-Tek PRISMA kudovärjäysautomaatti (Sakura.2013).

3.3.2 PAS-värjäyksen suoritus

PAS-värjäys suoritettiin Tissue-Tek DRS 2000 laitteella. Kontrollikudosten värjäykseen käytettiin HUSLABin värjäysprotokollaa (Liite 2.). Absoloidun etanolin jälkeen tehtiin vielä ksyleenikäsittelyn, jonka jälkeen lasit peiteltiin Tissue-Tek SCA-laitteella. Konevärjäysten virhelähteet tehtiin Tissue-Tek DRS 2000 laitteella (Kuvio 4).



Kuvio 4. Sakuran Tissue-Tek DRS 2000 kudovärjäysautomaatti (Sakura.2013).

3.3.3 AB-PAS-värjäyksen suoritus

AB-PAS-värjäys suoritettiin Tissue-Tek DRS 2000 laitteella (Kuvio 4). Kontrollikudosten värjäykseen käytettiin HUSLABin värjäysprotokollaa (Liite 3.). Absoloidun

etanolin jälkeen tehtiin vielä ksyleenikäsittely, jonka jälleen lasit peiteltiin Tissue-Tek SCA-laitteella. Konevärjäysten virhelähteet tehtiin Tissue-Tek DRS 2000 laitteella.

3.3.4 Herovici-värjäyksen suoritus

Herovici-värjäys suoritettiin Tissue-Tek DRS 2000 laitteella (Kuvio 4). Kontrollikudosten värjäykseen käytettiin HUSLABin värjäysprotokollaa (Liite 4). Absoloidun etanolin jälkeen tehtiin vielä ksyleenikäsittely, jonka jälleen lasit peiteltiin Tissue-Tek SCA-laitteella. Konevärjäysten virhelähteet tehtiin Tissue-Tek DRS 2000-laitteella.

3.3.5 Giemsa-värjäyksen suoritus

Giemsa-värjäys suoritettiin Sakura Tissue-Tek PRISMA laitteella (Kuvio 3). Kontrollikudosten värjäykseen käytettiin HUSLAB:n värjäysprotokollaa (Liite 5.). Ksyleenikäsittelyn jälleen lasit peiteltiin Tissue-Tek film-laitteella. Konevärjäysten virhelähteet tehtiin Sakura Tissue-Tek PRISMA laitteella.

3.4 Mikroskopointi ja leikkeiden kuvaaminen

Lopuksi leikkeet mikroskopoitiin ja valokuvattiin. Jokaisessa kudostyyppissä käytettiin valokuvauksessa aina samaa valotusta, jotta värjäystulokset olisivat paremmin verrattavissa toisiinsa.

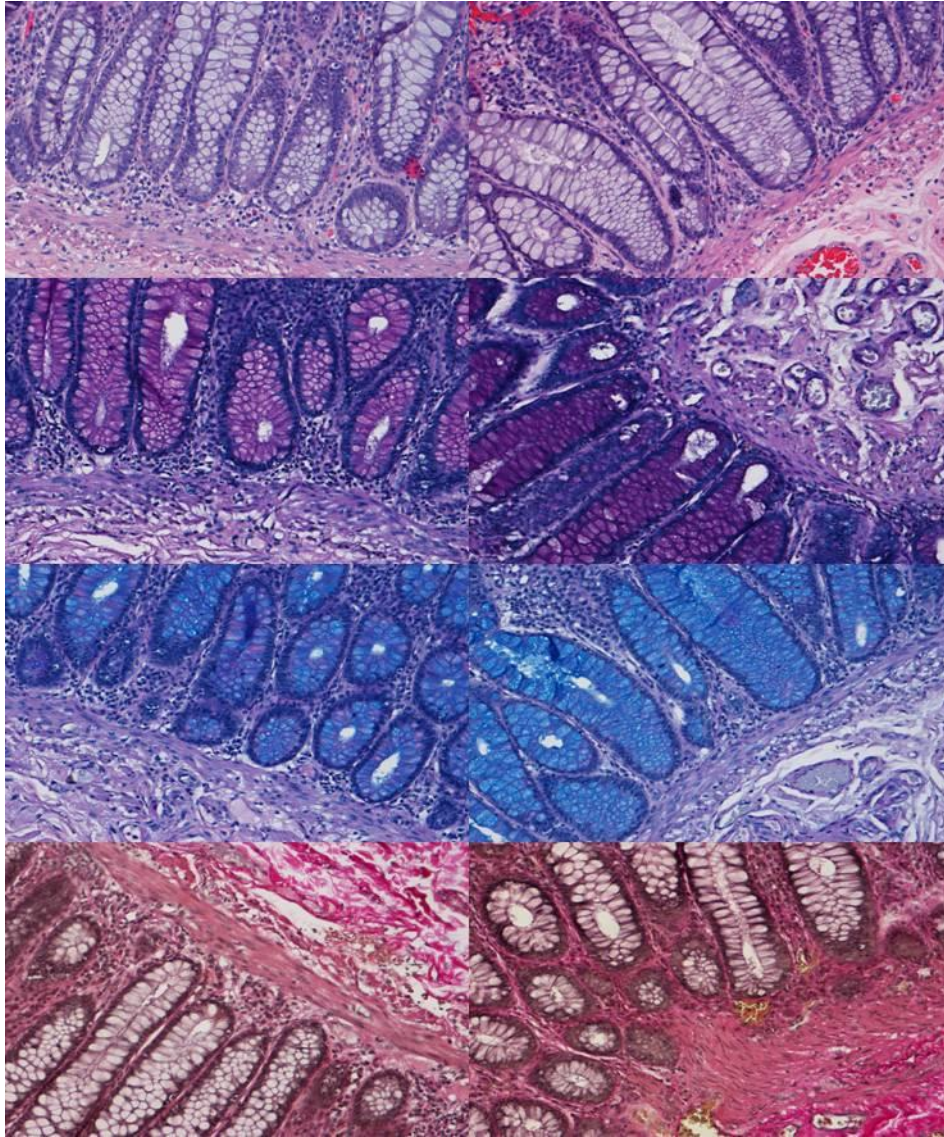
4 Koneellisten värjäysvirhelähteiden tulokset

Työn tarkoituksena oli valmistaa opetusmateriaalia. Tämän kappaleen tarkoituksena on käydä läpi tulokset liittyen opetusmateriaalin puitteissa aikaisemmin esitettyihin tutkimuskysymyksiin. Kappaleessa käydään läpi edellä mainitsemieni virhelähteiden vaikutukset histologisiin konevärjäksiin. Koska varsinaisen työni tarkoituksena oli tuottaa opetusmateriaalia, tässä kappaleessa esitetään muutamia leikekuvia vain esimerkinomaisesti. Varsinaiset leikekuvat selityksineen löytyvät valmistetusta opetusmateriaalista.

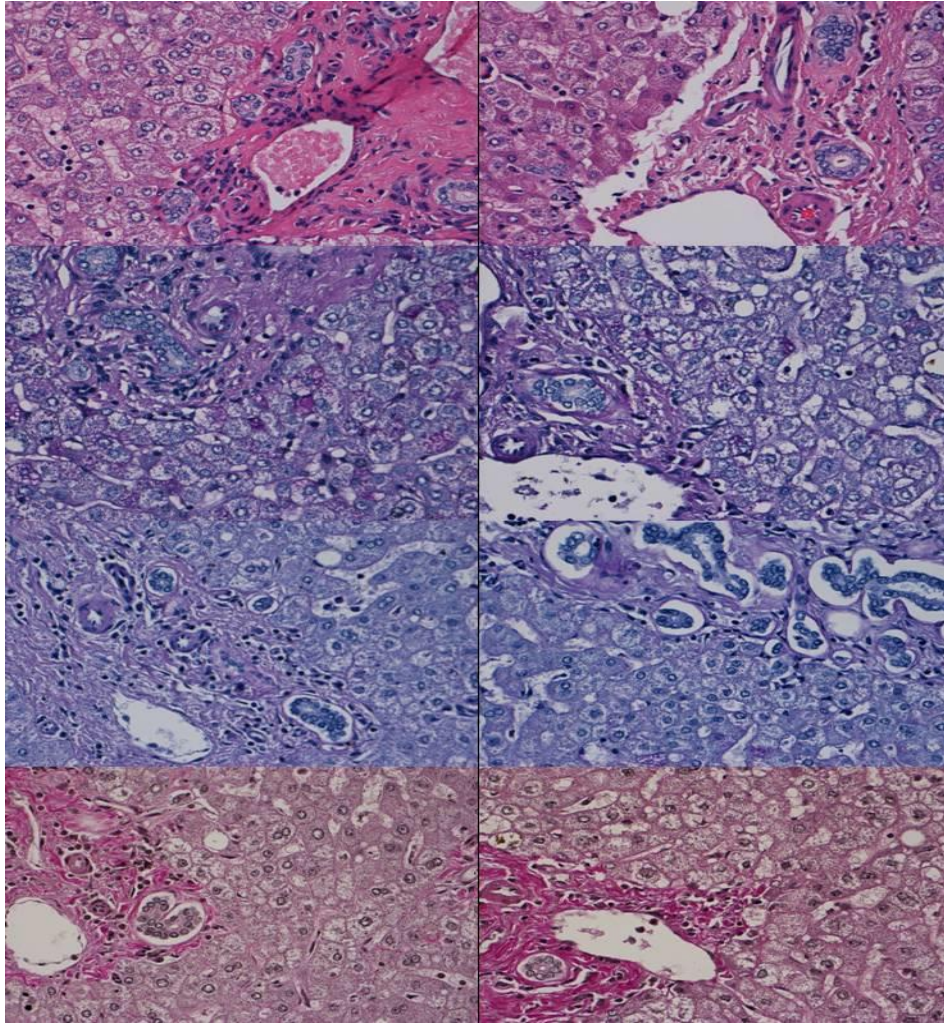
4.1. Kudosprosessoinnin laite-erojen vaikutus histologisiin konevärjäyksiin

HUSLABin keskuspatologia 1 ja 2 kudosprosessointi eroavat toisistaan. Kudosprosessointi tehdään keskuspatologia 1:ssä Thermo Shandon Pathcentrellä ja 2:ssa Sakuran Tissue-Tek Xpress x120 kudosprossessorilla. Nämä kahden laitteen väliset erot kudoksen prosessoinnissa voivat vaikuttaa värjäyksen lopputulokseen. Tässä kappaleessa analysoin kudosprosessoinnin aiheuttamia eroja histologiassa konevärjäyksissä. Varsinaisessa opetusmateriaalissani esittelen kuvia kuudesta erilaisesta kudoksesta. Materiaalissa asetetaan havainnoimista aktivoivat kysymykset: Huomaatko sävyeroja kuvia tarkastellessasi? Onko sävyerot kudosspesifisiä?

Kuviossa 2 esitellään kuudessa eri kudoksessa viidellä eri värjäyksellä kahden eri kudosprosessointimenetelmän eroja. Kuvioista 2 ja 3 voidaan havaita eroja riippuen kudosprosessointiin käytetystä koneesta, värjäyksestä ja kudoksesta. Talmanin ym. (2008) tutkimuksessa verrattiin perinteistä ja mikroaaltoja käyttävää kudosprossoria toisiinsa. Tutkimuksen mukaan HE-värjäyksen värjäysaikaa oli lyhennettävä niiden leikkeiden kohdalla, jotka oli prosessoitu mikroaaltoja hyväksikäyttämällä. (Talman – Hasselager 2008: 899.) Myös Talmanin ym. (2008) tutkimuksessa havaittiin, että mikroaaltoja käyttävän ja perinteisen kudosprossessorin erot näkyivät selvemmin tietyissä kudoksissa. Tässä tutkimuksessa eroja oli havaittavissa tietyissä kudoksissa, joista esimerkkinä suoli. Eroja syntyi myös värjäysten välille. Esimerkiksi Herovici värjäyksiä kohdalla erot kahden kudosprossessorin välillä olivat suurimmat. Värjäystulokset olivat intensiivisemmät mikroaaltoja hyväksikäyttäneen kudosprosessoinnin läpi käyneissä kudoksissa. Voi olla mahdollista, että eri väriaineet sitoutuvat eri tavoin kudosprosessointimenetelmästä riippuen. Mikroaaltokäsittely saattaa paljastaa enemmän väriaineidensitoutumispaikkoja tai esimerkiksi avata kudosta niin, että väriaineet pääsevät sitoutumaan paremmin tiheämpäänkin kudokseen. Tämä on nähtävissä maksakudoksen Herovici-värjäyksessä, jossa suuri-molekyylinen happofuksiini on värjännyt löyhän sidekudoksen huomattavasti voimakkaammin kudoksessa, joka on prosessoitu mikroaaltoja apunakäyttäen (kuvio 3).



Kuvio 2. Suolikudoksen neljä eri perusvärjäystä ylhäältä alaspäin: HE, PAS, AB-PAS ja Hero-vici. Vasemmalla kudospesointi on tehty Thermanon valmistamalla laitteella, oikealla kudospesointi on tehty mikroaalloja apuna käyttävällä Sakuran valmistamalla kudospesosorilla.

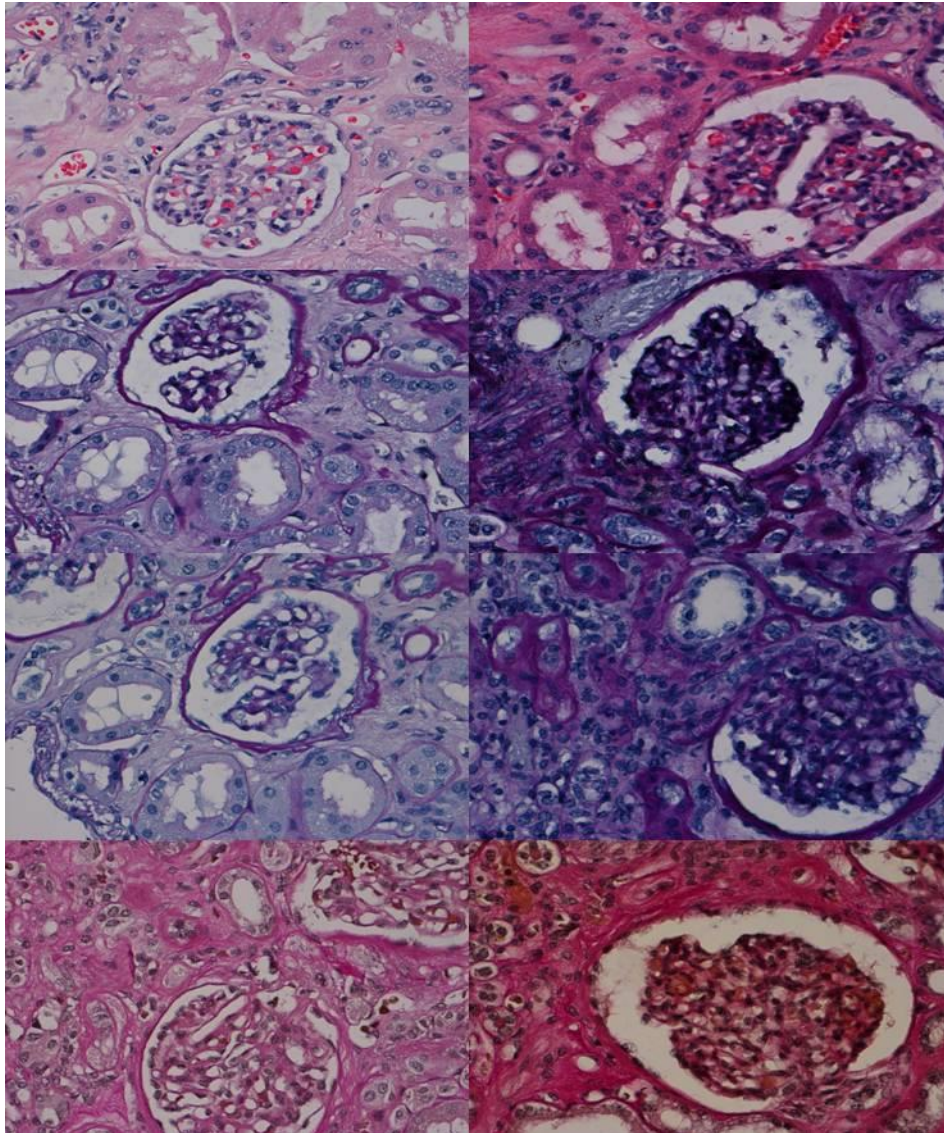


Kuvio 3. Maksakudoksen neljä eri perusvärjäystä ylhäältä alaspäin: HE, PAS, AB-PAS ja Hevovici. Vasemmalla kudospesointi on tehty Thermo valmistamalla laitteella, oikealla kudospesointi on tehty mikroaaltoja apuna käyttävällä Sakuran valmistamalla kudospesosorilla.

4.2 Leikepaksuuden vaikutus histologisissa konevärjäyksissä

Kudosleikkeen paksuus vaikuttaa lopputulokseen, siksi tässä kappaleessa tarkastelen saamiani tuloksia liittyen leikepaksuuden valintaan. Tässä työssä kaikki kontrollileikkeet ovat 3 µm paksuisia. Jotta leikepaksuutta voitaisiin vertailla, leikkasin jokaisesta kudoksesta myös 8 µm paksuisia leikkeitä, joista jokaisesta tehtiin neljästä viiteen perusvärjäystä. Opetusmateriaalissa asetetaan havainnoimista aktivoivat kysymykset: Kumpi leikkeistä on paksumpi? Pystytkö erottamaan paksummasta leikkeestä esimerkiksi solujen tumat kunnolla? Varsinaisessa opetusmateriaalissani esittelen kuvia kuudesta erilaisesta kudoksesta tässä yhteydessä esittelen kuvan esi-merkinomaisesti vain munuaiskudoksesta (Kuvio 4). Kuviossa 4 esitellään eri värjäyksillä kahden eri leikepaksuuden eroja. Leikepaksuuden erot voidaan havaita jokaisessa eri kudoksessa jokaisella eri värjäyksellä. 8 µm:n paksuinen leike värjäytyy

selkeästi voimakkaammin. Kudoksen rakenteet ja solujen tumat ovat vaikeammin erotettavissa johtuen liian monesta päällekkäisestä solukerroksesta.

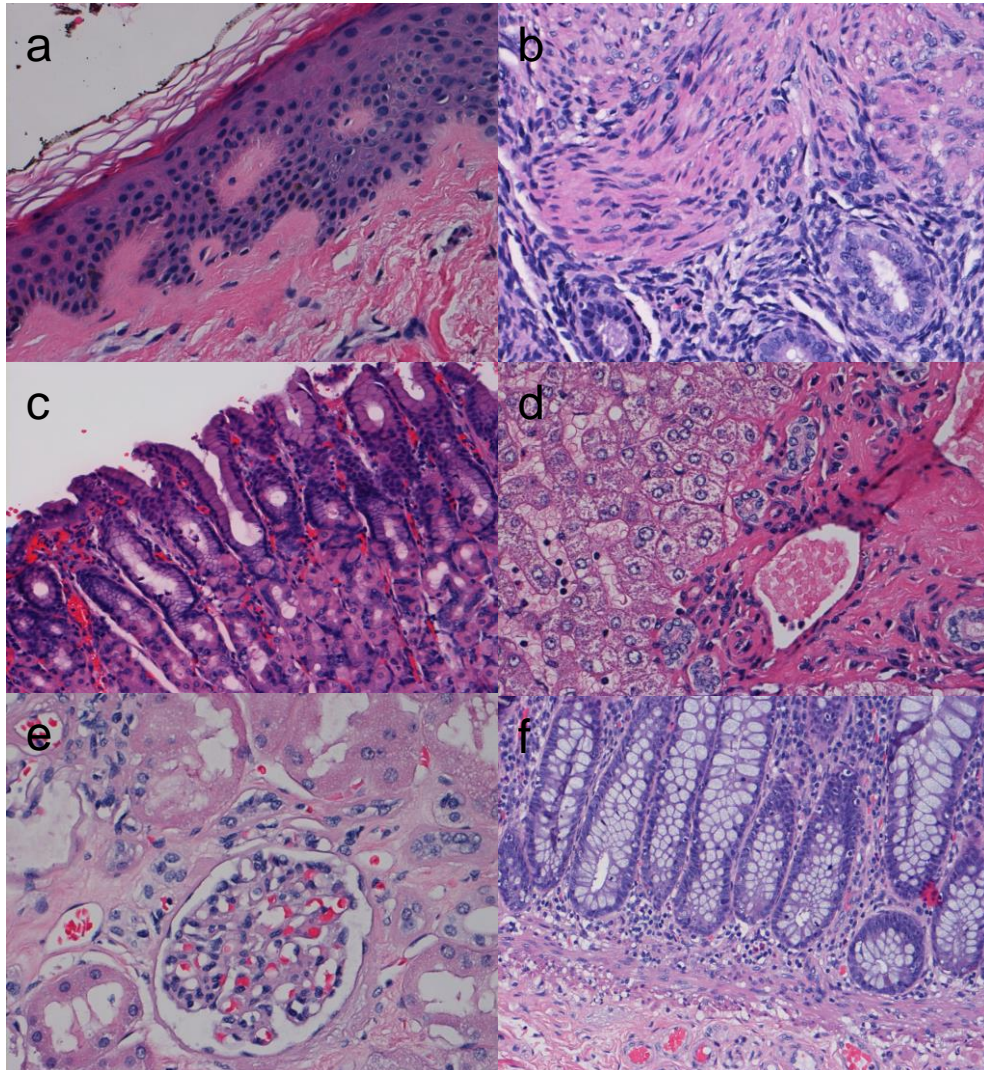


Kuvio 4. Munuaiskudoksen neljä eri perusvärjäystä ylhäältä alaspäin: HE, PAS, AB-PAS ja Herovici. Vasemmalla leikepaksuus 3 μm, oikealla leikepaksuus 8 μm.

4.3 HE-värjäyksen virhelähteet

Tässä kappaleessa esittelen tulokset HE-värjäyksen yleisimmistä virhelähteistä. HE-värjäyksellä tumat värjäytyvät sinisen mustiksi ja sytoplasmat vaaleanpunaisen eri sävyillä. Lihassyt värjäytyvät syvän punaisiksi, punasolut oranssin punaisiksi ja fibriini syvän vaaleanpunaiseksi (HUSLAB, ohjekirja). Kuviossa 5. on esitetty normaalin HE-värjäyksen tuloksia kuudessa eri kudoksessa: ihossa, kohdussa, vatsassa, mak-sassa, munuaisessa ja suolessa. Varsinaisessa opetusmateriaalissa kuvia esitetään

kuudesta eri kudoksesta, lisäksi annetaan aktivoiva tehtävä: Mieti minkä väriset tumat ovat? Millaiset värisävyt? Miksi?

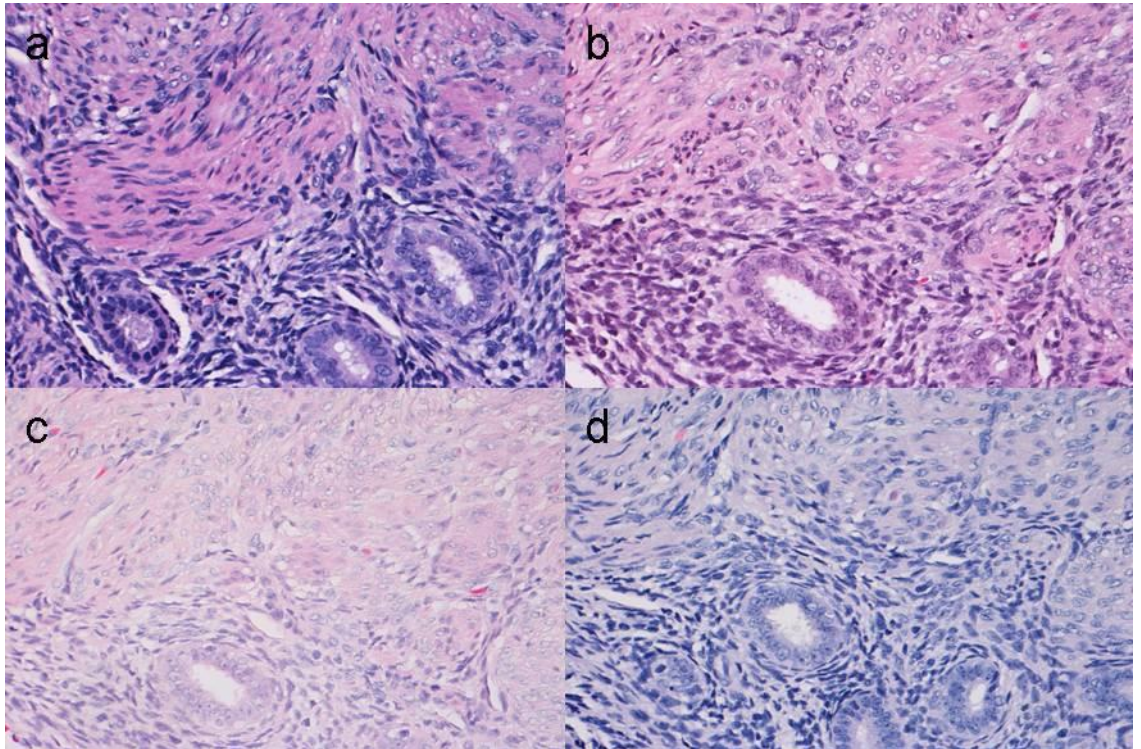


Kuvio 5. HE-värjäys eri kudoksissa. a) Iho, b) kohtu, c) vatsa, d) maksa, e) munuainen, f) suoli

HE-värjäyksen virhelähteitä ovat: Mayerin hematoksyliini -käsittelyn ja HCl-käsittelyn jälkeen tapahtuvan vesihuuhtelun puuttuminen. HCl-käsittelyyn tarvittavan liuoksen väärä valmistustapa, tässä työssä käytin liian vahvaa HCl-luosta. Eosiinivärjäyksen jälkeisen etanolin avulla tapahtuvan ylimääräisen värin poistamiseen käytetyn ajan piteneminen esimerkiksi laiterikon vuoksi. Kuviossa 6. on esitetty esimerkinomaisesti edellä mainitut koneellisen HE-värjäyksen virhelähteet kohtukudoksessa ja niiden vaikutus värjäystulokseen.

Hematoksyliini värjää tumat ensin punaisiksi, tumat muuttuvat edelleen mustansinisiksi kun leikkeet pestään heikosti alkaalisella liuoksella. Yleensä hanavesi on tähän takoitukseen tarpeeksi alkaalista. (Bancroft – Gamble 2008: 121.) Kuviosta 6b voidaan nähdä, miten hanavesihuuhtelun puuttuminen jättää kudoksen ja tumat punasävyiseksi. Hematoksyliinivärjäystä käytettäessä, eosini on paras väri kun halutaan esille kudoksen rakenne. Emäksisiin ryhmiin sitoutunut eosini on hapan ksantiiniväri, joka tunkeutuu hyvin tiheisiin ja löyhiin kudoserakenteisiin värjäten nämä punaisen eri sävyillä. (Bancroft - Gamble 2008: 121.) Eosini on dissosioituneena melko laajalla pH-alueella, ainoastaan hyvin happamassa (< pH 4) se on varauksettomassa muodossa ja tarttuu kudokseen epäspesifisesti. Kudospoteinien nettovaraus on positiivinen kun pH on alle 6. Sytoplasman proteiinien värjäämiseen käytettävä pH-väli on siis noin 4-6. (Londesborough – Pekkarinen-Kouki – Salama - Tähkä 2004: 22.) Kuviosta 6c voidaan nähdä miten liian vahvaa HCl-liuosta käytettäessä värjättävä kudos on liian hapan eosinivärjäykselle ja eosini sitoutuu kudokseen epäspesifisti. Värjäystulos on hyvin vaalea.

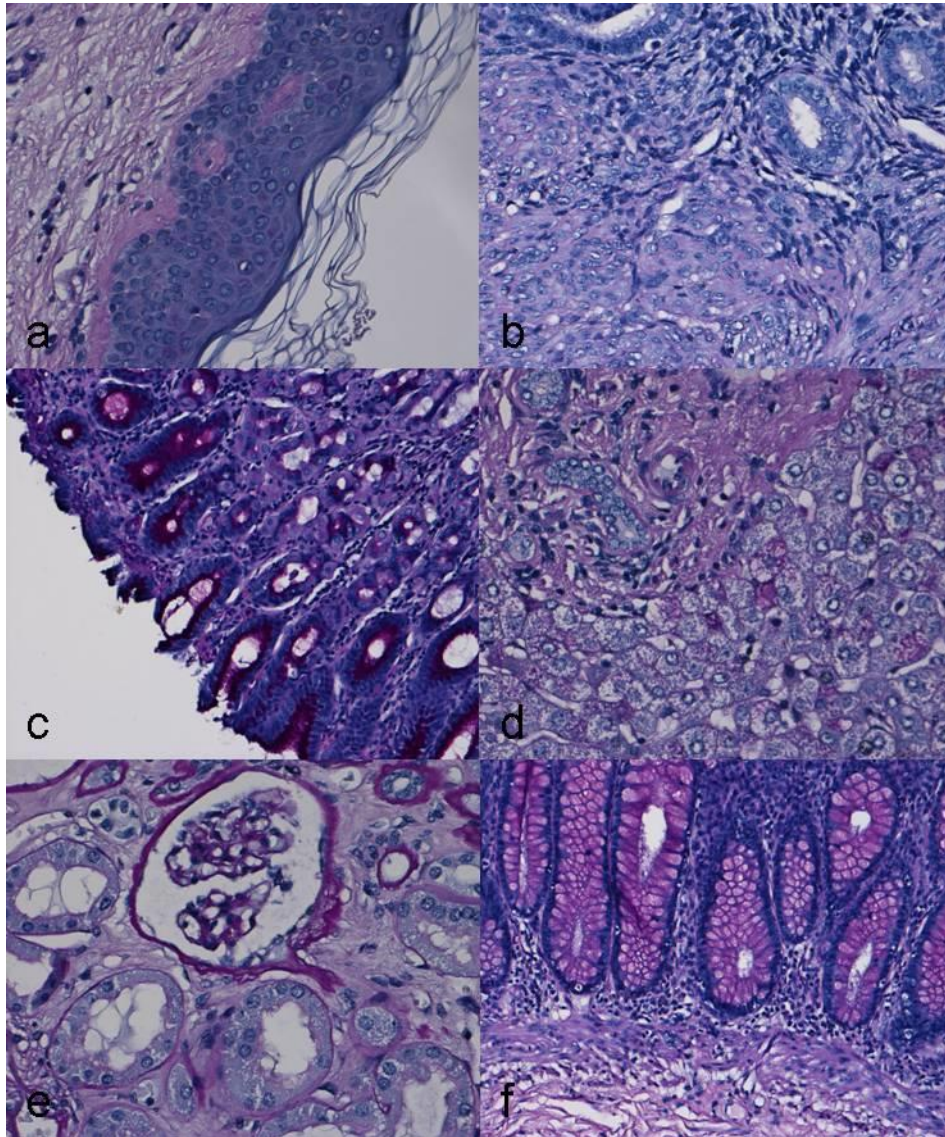
Hematoksyliinin ongelma tumavärinä on, että se on hyvin herkkä lisätyille happamille värjäysliuoksille (Bancroft – Gamble 2008: 121). Liian vahva HCl-liuos hematoksyliinivärjäyksen jälkeen ennen eosinivärjäystä näyttäisi vaikuttavan myös hematoksyliinin värjäystulokseen. Eosinivärjäyksen jälkeen tapahtuvan etanolikäsittelyn tarkoituksena on poistaa ylimääräinen väri. Näyttäisi siltä, että liian pitkä etanolikäsittely vaikuttaa etenkin Mayerin hematoksyliinivärin irtoamiseen.



Kuvio 6. Kohtukudoksen HE-värjäys ja sen virhelähteet. a) kontrolli, b) hanavesihuuhtelun puuttuminen c) väärin valmistetun HCl-liuoksen vaikutus d) pitkä etanolikäsitely.

4.4 PAS-värjäyksen virhelähteet

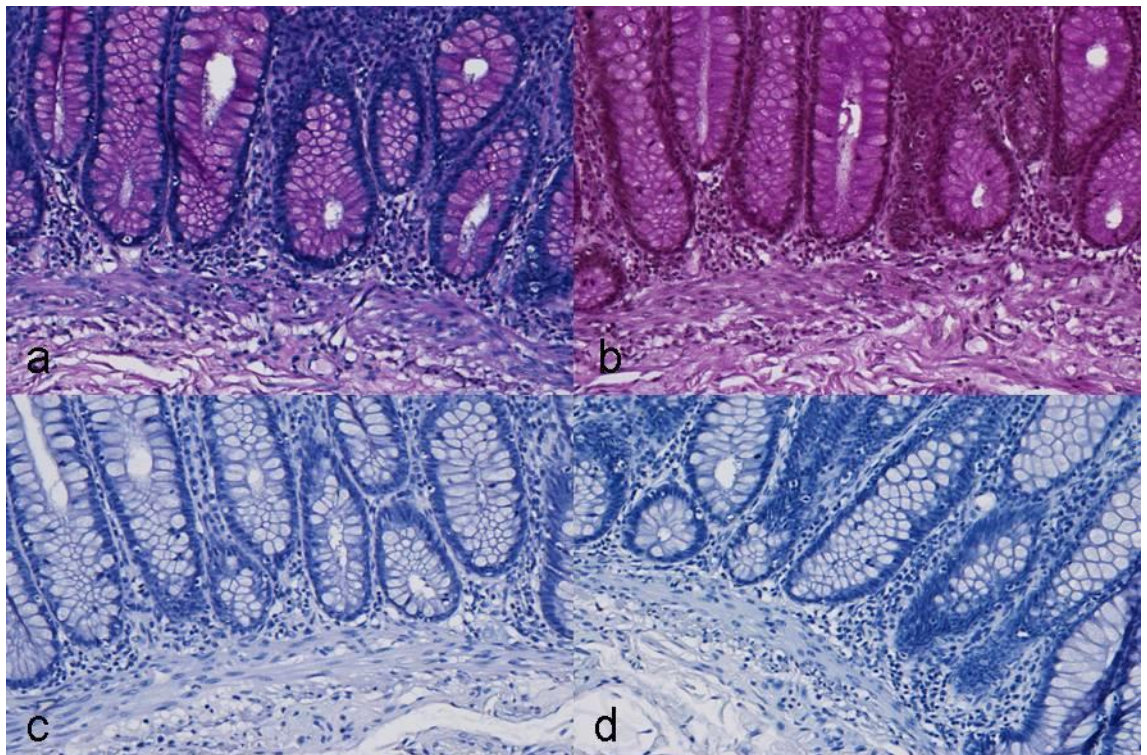
Tässä kappaleessa esittelen tulokset PAS-värjäyksen yleisimmistä virhelähteistä PAS-värjäyksellä glykogeeni ja lima värjäytyvät purppuranpunaisiksi. Tummat värjäytyvät sinisiksi ja sienet sekä loiset punaisiksi. (HUSLABin ohjekirja.) Kuviossa 7. on esitetty PAS-värjäyksen tuloksia kuudessa eri kudoksessa: ihossa, kohdussa, vatsassa, maksassa, munuaisessa ja suolessa. Varsinaisessa opetusmateriaalissa kuvia esitetään kuudesta eri kudoksesta, lisäksi annetaan aktivoiva tehtävä: Mieti mikä eri kudoksissa värjäytyy minkäkin sävyiseksi? Millaiset värisävyt? Miksi?



Kuvio 7. PAS-värjäys eri kudoksissa. a) Iho, b) kohtu, c) vatsa, d) maksa, e) munuainen, f) suoli

PAS-värjäyksen virhelähteitä ovat: Ennen perjodihappokäsittelyä, perjodihappokäsittelyn jälkeisen, Schiff-värjäyksen ja Mayerin hematoksyliini värjäyksen jälkeen tapahtuva hanavesikäsittelyn puuttuminen. Schiffin reagenssin tai perjodihapon vanheneminen. Kuviossa 8 on esitetty edellä mainitut koneellisen PAS-värjäyksen virhelähteet suolikudoksessa ja niiden vaikutus värjäystulokseen. Kuviota tarkastelemalla voidaan huomata, että PAS-värjäyksessä vesihanan avaamisen unohtaminen "punaistaa" värjäystuloksen. Schiffin reagenssi antaa kudokselle punaisen sävyn, kuviosta 8b voidaan havaita miten vesihuuhtelun puuttuessa ylimääräinen väri ei pääse huuhtoutumaan pois. Vanhentuneen Schiffin reagenssin vaikutus on nähtävissä kuviossa 8c. Schiffin-reagenssin antama punainen sävy puuttuu kokonaan.

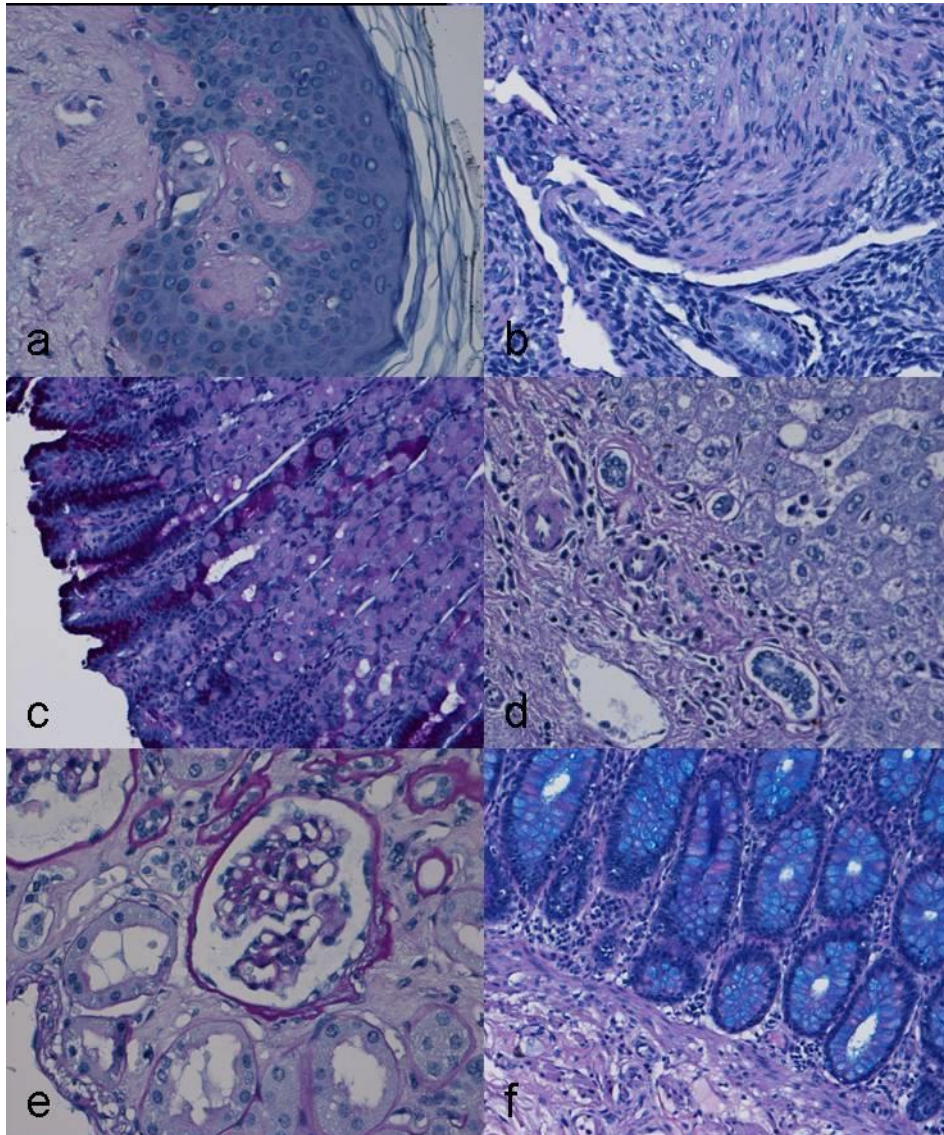
Hiilihydraateilla, aminohapoilla, proteiineilla ja steroideilla esiintyy sisäisiä glykoliryhmiä tai näiden amino- tai alkylaminojohdannaisia, jotka perjodihappo hapettaa dialdehydeiksi. Nämä dialdehydit voivat puolestaan muodostaa liukenemattoman, punaisen värikompleksin Schiffin-reagenssin kanssa. (Bancroft JD ja Gamble M. 2008; Londesborough A. ym. 2004.) Kuviosta 8d voidaan nähdä miten perjodihapon puuttumisen vuoksi sisäiset glykoliryhmät eivät hapetu eivätkä näin reagoi Schiffin reagenssin kanssa, eikä punaista värikompleksia synny.



Kuvio 8. Suolikudoksen PAS-värjäys ja sen virhelähteet. a) kontrolli b) hanavesihuuhtelun puuttuminen c) vanhentuneen Schiff-reagenssin vaikutus d) vanhentuneen perjodihapon vaikutus.

4.5 AB-PAS-värjäyksen virhelähteet

Tässä kappaleessa esittelen AB-PAS-värjäyksen virhelähteiden tuloksia. AB-PAS-värjäyksellä gykogeeni ja lima värjäytyvät purppuranpunaisiksi. Tumat värjäytyvät sinisiksi ja happamat mukopolysakkaridit sinisen turkooseiksi. (HUSLABin käsikirja.) Kuviossa 9. on esitetty AB-PAS-värjäyksen tuloksia 6 eri kudoksessa: ihossa, kohdussa, vatsassa, maksassa, munuaisessa ja suolessa. Varsinaisessa opetusmateriaalissa kuvia esitetään kuudesta eri kudoksesta, lisäksi annetaan aktivoiva tehtävä: Mieti mikä eri kudoksissa värjäytyy minkäkin sävyiseksi? Millaiset värisävyt? Miten virheelliset värjäykset ovat erilaiset?

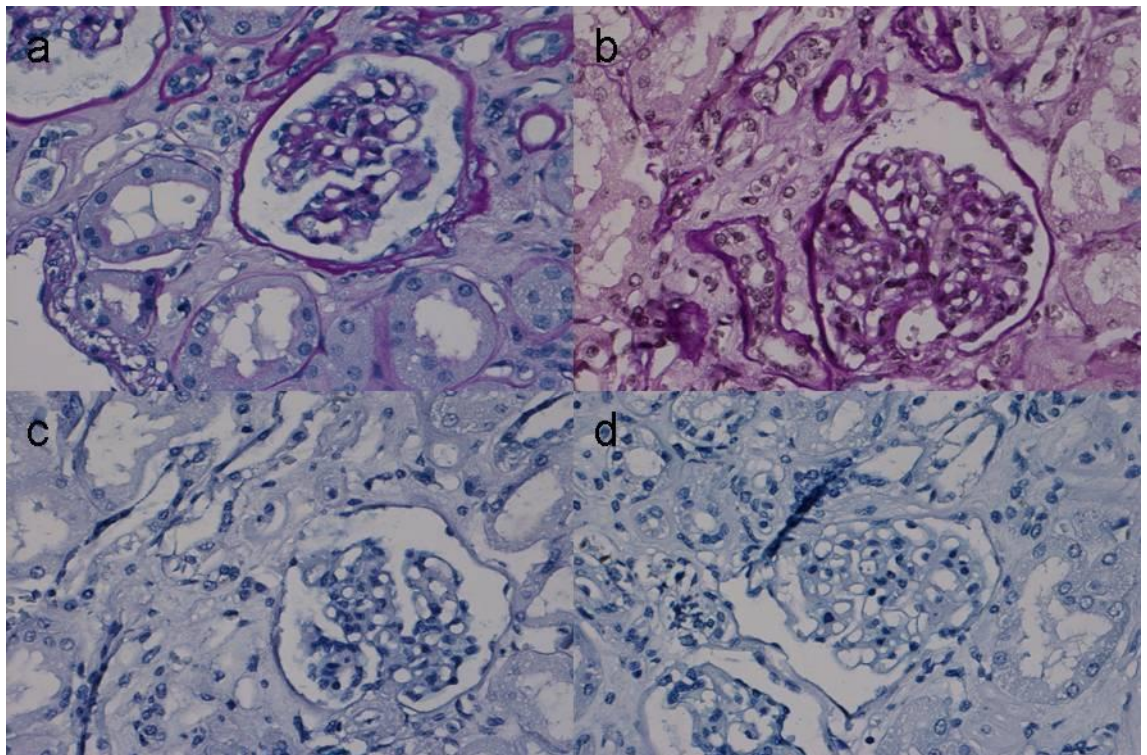


Kuvio 9. AB-PAS-värjäys eri kudoksissa. a) Iho, b) kohtu, c) vatsa, d) maksa, e) munuainen, f) suoli

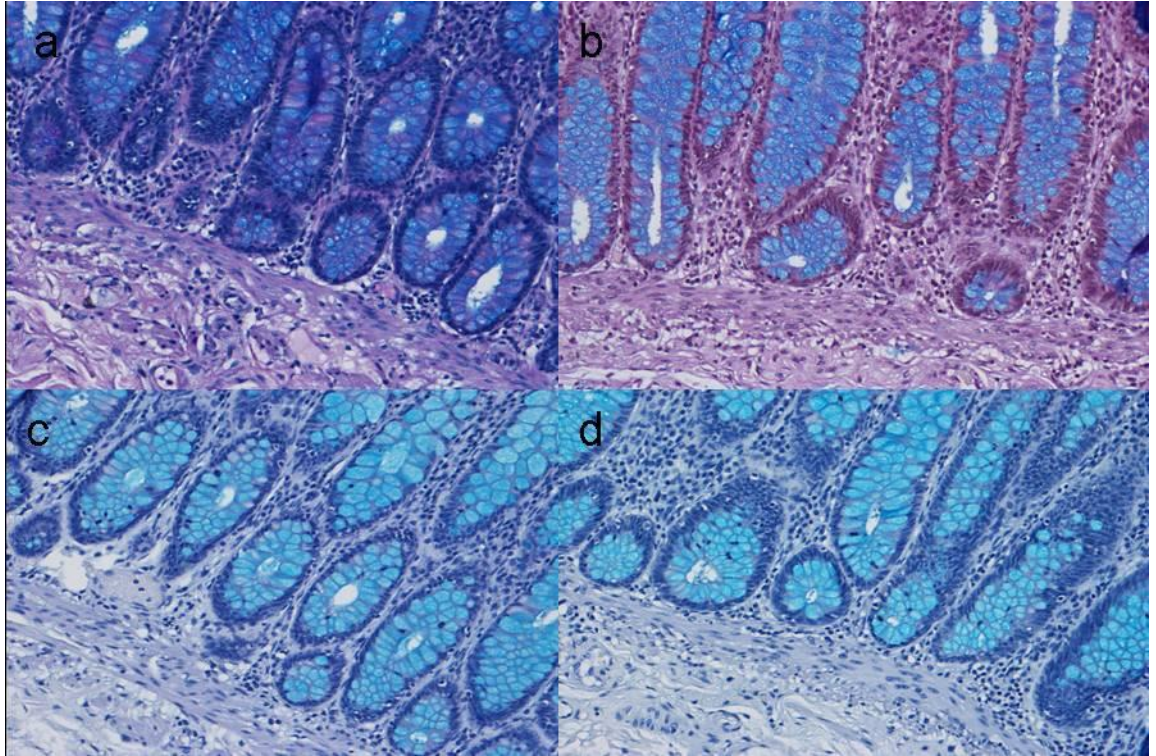
AB-PAS-värjäyksen virhelähteitä ovat: Ennen Alcian blue ja perjodihappokäsittelyä, perjodihappokäsittelyn jälkeisen, Schiff-värjäyksen ja Mayerin hematoksyliini värjäyksen jälkeen tapahtuva hanavesikäsitteilyn puuttuminen sekä Schiffin reagenssin tai perjodihapon vanheneminen. Kuvioissa 10-11 on esitetty edellä mainitut koneellisen PAS-värjäyksen virhelähteet kahdessa eri kudoksessa ja niiden vaikutus värjäystulokseen. Kuvioita 10b ja 11b tarkastelemalla voidaan huomata, että AB-PAS-värjäyksessä vesihanavan avaamisen unohtaminen "punaistaa" värjäystuloksen samalla tavalla kuin edellä esitettyssä PAS-värjäyksessäkin. Schiffin-reagenssi antaa kudokselle punaisen sävyn, vesihuuhtelun puuttuessa ylimääräinen väri ei pääse huuhtoutumaan pois (kuviot 10-11 b). Toimimattoman Schiffin reagenssin vaikutus

on nähtävissä kuvissa 10-11 c., punainen sävy puuttuu kokonaan. Kuten PAS-värjäyksessäkin, perjodihapon puuttumisen vuoksi sisäiset glykoliryhmät eivät haperu eivätkä näin reagoi Schiffin reagenssin kanssa, jolloin punaista värikompleksia ei synny (Kuviot 10-11 d).

Happamat mukopolysakkaridit eivät yleensä osoita PAS-positiivisia reaktioita, koska glykoliryhmä on sitoutunut sulfaatilla. Tämän vuoksi ne osoitetaan Alcian Blue – värjäyksellä, jossa positiiviset ryhmät reagoivat happamien limojen karboksyyli- ja sulfaattiryhmien kanssa. AB-PAS-värjäys erottelee happamat ja neutraalit lima-aineet. Happamat lima-aineet reagoivat Alcian Blue-värjäyksessä eivätkä enää reagoi PAS-värjäykseen. (Londesborough A. ym. 2004.) Kuviossa 11c-d Schiffin-reagenssi ei pääse sitoutumaan kudokseen, tämän vuoksi alsianin sinisen värin sitoutuminen happamiin mykopolysakkarideihin nähdään hyvin.



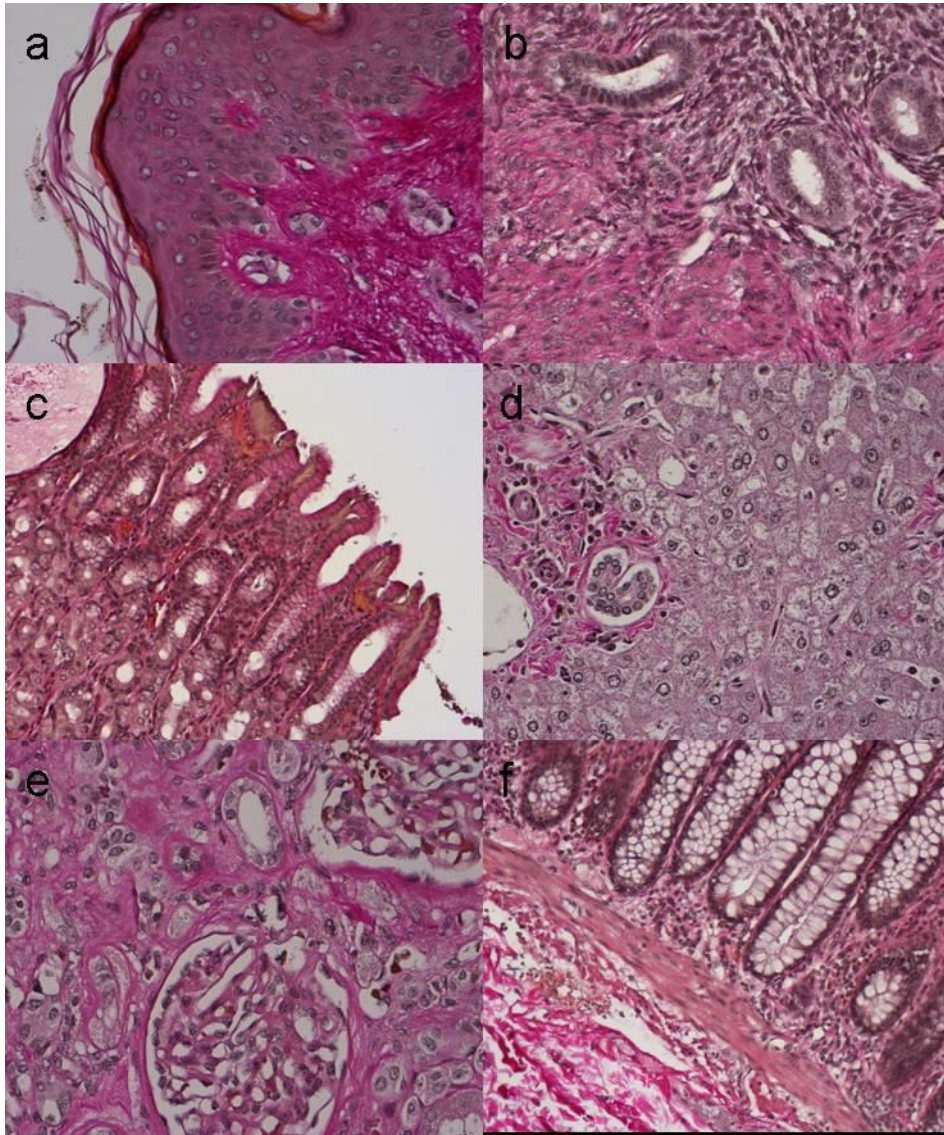
Kuvio 10. Munuaiskudoksen AB-PAS-värjäys ja sen virhelähteet. a) kontrolli b) hana-vesihuuhtelujen puuttuminen c) vanhentuneen Schiff-reagenssin vaikutus d) vanhentuneen perjodihapon vaikutus.



Kuvio 11. Suolikudoksen AB-PAS-värjäys ja sen virhelähteet. a) kontrolli b) hanavesihuuhtelujen puuttuminen c) vanhentuneen Schiff-reagenssin vaikutus d) vanhentuneen perjodiapon vaikutus.

4.6 Herovici-värjäyksen virhelähteet

Tässä kappaleessa esittelen Herovici-värjäyksen tuloksia liittyen konevärjäysten yleisimpiin virhelähteisiin. Herovici-värjäyksellä tumat värjäytyvät tumman ruskeiksi, lähes mustiksi. Sytoplasma värjäytyy keltaiseksi, kypsä kollageeni punaiseksi, nuori kollageeni ja retikuliini siniseksi. (Stainsfile. 2012.) Kuviossa 12. on esitetty Herovici-värjäyksen tuloksia kuudessa eri kudoksessa: ihossa, kohdussa, vatsassa, maksassa, munuaisessa ja suolessa. Varsinaisessa opetusmateriaalissa kuvia esitetään kuudesta eri kudoksesta, lisäksi annetaan aktivoiva tehtävä: Mieti mikä eri kudoksissa värjäytyy minkäkin sävyiseksi? Millaiset värisävyt? Minkävärisiksi esimerkiksi tumat värjäytyvät virhelähdekuvissa?



Kuvio 12. Herovici-värjäys eri kudoksissa. a) Iho, b) kohtu, c) vatsa, d) maksa, e) munuaisten, f) suoli

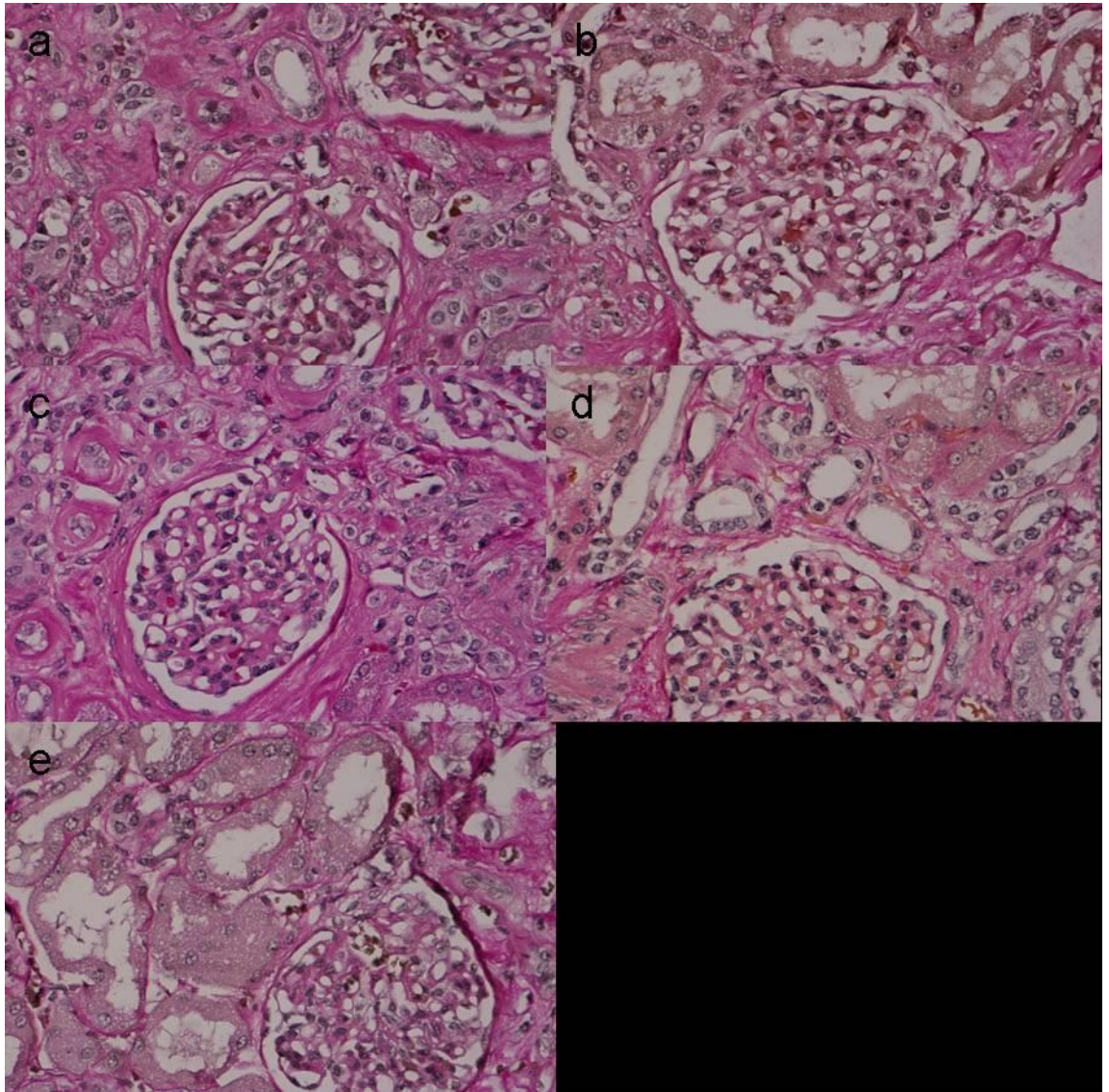
Herovici-värjäyksen virhelähteitä ovat: Weigertin hematoksyliini-värjäyksen jälkeen tapahtuvan hanavesihuuhtelun puuttuminen, Weigertin hematoksyliinin liian lyhyt kypsymisaika, metanil yellown toimimattomuus ja liian laimean pikropolykromiliuoksen käyttäminen.

Kuviossa 13 on esitetty edellä mainitut koneellisen Herovici-värjäyksen virhelähteet munuaiskudoksessa ja niiden vaikutus värjäystulokseen. Kuviossa 13b nähdään miten vesihanavan avaamisen unohtaminen vaikuttaa lopulliseen värjäystulokseen. Heikosti alkalisesta hanavesihuuhtelun puuttuminen jättää kudokseen kellertävän sävyn. Herovici-värjäyksessä käytettävällä hematoksyliinin väriaineella, hemateiinilla on huono kudosaaffiniteetti. Tämän vuoksi värjäyksessä käytetään peitta-aineena rautakloridia. Peitta-aineen avulla kationinen hemateiini sitoutuu happamiinkudos-

komponentteihin, erityisesti nukleinihappoihin ja tämän vuoksi tumat näkyvät tummanruskeina. HUSLABin ohjeen mukaan Weigertin hematoksyliiniliuosta täytyy kypsyttää auringonvalossa hapekkaissa olosuhteissa yhden kuukauden ajan. Weigertin hematoksyliiniliuoksen liian vähäisen kypsymisen vaikutuksia testattiin käyttämällä tuoretta vasta valmistettua liuosta. Kuviosta 13d voidaan havaita miten tumien värjäytyminen eroaa kontrollivärjäyksen tumien väristä.

Työssä käytettiin virhelähteenä laimeaa pikrokromiliuosta. Liuos valmistettiin laimentamalla alkuperäistä pikropolykromiliuosta fuksiiniliuoksella. Suurimolekyylinen happofuksiini tunkeutuu vain löyhään sidekudokseen ja käyttämässämme pikropolykromiliuoksessa oli ylimäärin fuksiiniliuosta. Kuviosta 13 c voidaan nähdä fuksii-ninpunainen värisävy, joka on kontrollivärjäystä voimakkaampi. Pienimolekyylisenä aineena pikriinihappo tunkeutuu tiiviisiin kudoksiin, mutta selkeää laimean pikriinihapon vaikutusta ei kuvista voida havaita. Vaikutus voi peittyä voimakkaan fuksiinivärin alle.

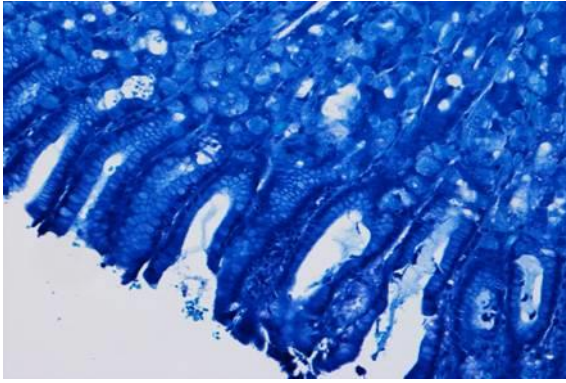
Metanil yellown tarkoituksena on värjätä sytoplasmat keltaisiksi (Stainsfile. 2012). Metanil yellown toimattomuuden vaikutukset voidaan havaita kuviosta 13e. Verratessa kontrollivärjäykseen, kudoksista näyttäisi puuttuvan keltainen värisävy.



Kuvio 13. Munuaiskudoksen Herovici-värjäys ja sen virhelähteet. a) kontrolli b) hana-vesihuuhtelujen puuttuminen c) laimea pikropolykromiliuos d) kypsymättömän Weigertin hematoksyliini-liuoksen käyttäminen e) toimimattoman metanil yellown vaikutus.

4.7 Giemsa-värjäyksen virhelähteet

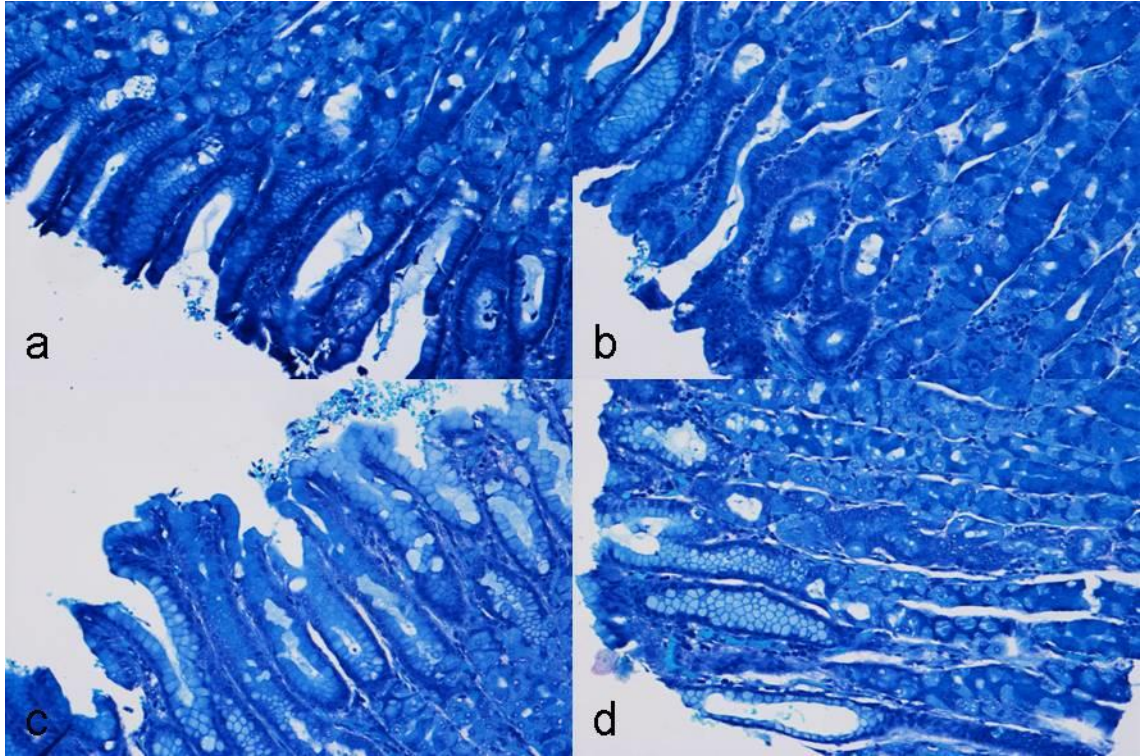
Giemsa-värjäyksellä tumat värjättyvät sinisiksi. Mikro-organismit tummansinisiksi ja muu kudos vaaleanpunaisten ja sinisten eri sävyillä (HUSLABin käsikirja). Giemsa-värjäystä käytetään etenkin gastroskopia näytteiden helikobakteerien ja parasiittien diagnosoimiseen. Kuviossa 14. on esitetty Giemsa-värjäyksen tulos vatsakudoksessa. Varsinaisessa opetusmateriaalissa annetaan aktivoiva tehtävä: Mieti minkä väriset tumat ovat? Millaiset värisävyt? Onko virhelähdekuviissa eroja värisävyissä?



Kuvio 14. Giemsa-värjäys vatsakudoksessa.

Giemsa-värjäyksen virhelähteitä ovat: ennen varsinaista Giemsa-värjäystä tapahtuvan hanavesihuuhtelun puuttuminen, liian pitkä etanolissa värjäyksen lopussa etanolilla tapahtuva differointiaika esimerkiksi koneen rikkoutuessa tai giemsaliuoksen vanheneminen eli hapettuminen. (Haastattelu: Sanna Aakko. 13.7.2012.)

Kuviossa 15. on esitetty edellä mainitut koneellisen Giemsa-värjäyksen virhelähteet vatsakudoksessa ja niiden vaikutus värjäystulokseen. Kuvioista 15c-d voidaan havaita miten vanha, hapettunut giemsaliuos sekä liian pitkä differointiaika värjäyksen lopussa saa aikaan kontrollivärjäystä vaaleamman lopputuloksen. Myös hanavesihuuhtelun puuttuminen vaikuttaa Giemsa-värjäyksen lopputulokseen, joka on kontrollia hieman vaaleampi. Tämä johtunee siitä, että giemsaväri ei ehkä pääse sitoutumaan kudokseen niin helposti kudoksessa olevan etanolin vuoksi.



Kuvio 15. Vatsakudoksen Giemsa-värjäys ja sen virhelähteet. a) kontrolli b) hanavesihuuhtelujen puuttuminen c) vanha, hapettunut giemsalios d) pitkä differentiaaika etanoliliuoksessa värjäyksen lopussa.

5 Yhteenveto

Tämän työn tarkoituksena oli luoda opetusmateriaalia erilaisten histologisten konevärjäysten virhelähteistä. Valmistunut malliarkisto tulee toimimaan HUSLABin uusien työntekijöiden sekä opiskelijoiden perehdyttämismateriaalina sekä Metropolia ammattikorkeakoulun opiskelijoiden opetusmateriaalina. Työn ei ollut tarkoitus ottaa kantaa solubiologisiin kudusrakenteisiin.

Värjäysten virhelähteiden edustavuus näyttäisi näkyvän eri tavoin kudoksesta riippuen. Toisessa kudoksessa virhelähde näkyy voimakkaammin kuin toisessa. Virhelähteiden vaikutukset on kuitenkin havaittavissa jokaisesta kuvasta. Vaihtelu värjäytymisen voimakkuudessa voi johtua siitä, että kudokset värjäytyvät eri tavoin riippuen siitä, mihin molekyyliin väriaine sitoutuu ja miten paljon kyseistä molekyyliä kudoksessa on. Kuvista voidaan havaita myös kudostyypistä riippumatonta väärinvärjäytymistä. Tällaisesta kudostyypistä epäspesifisestä väärinvärjäytyvyydestä esimerkkinä on vesihanahuuhtelun puuttuminen, jolloin leikkeet värjäytyvät punertaviksi kudostyypistä riippumatta. PAS ja AB-PAS-värjäyksissä vanhan perjodihapon

vaikutukset näkyivät loistavasti ja eroja värjäytyvydessä kudosten välillä ei ollut havaittavissa. Herovici-värjäyksessä tuoreen Weigertin hematoksyliinin käyttäminen saattoi osassa kudoksista jopa parantaa tumien värjäytyvyyttä. Schiffin reagenssin toimimattomuus näkyi kuvista punaisen sävyn puuttumisena. Työssä havaittiin myös eroja värjäytymisessä kahdella eri kudosprosessorilla käsiteltyjen kudosten välillä. Leikkeet, jotka oli prosessoitu mikroaaltoja apuna käyttäneellä kudosprosessorilla, värjäytyivät voimakkaammin. Leikepaksuus vaikutti selkeästi kudoksen värjäytyvyyteen, paksumpi leike värjäytyy selkeästi voimakkaammin. Kudoksen rakenteet ja solujen tumat olivat vaikeammin erotettavissa johtuen liian monesta päällekkäisestä solukerroksesta. Seuraavassa kappaleessa pohdin tulosten luotettavuutta, itse työprosessin etenemistä, jatkotutkimusmahdollisuuksia ja sitä millainen opeusmateriaali prosessissa syntyi.

6 Pohdinta

Työ pyrittiin tekemään niin, että tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia ja olosuhteet olisivat mahdollisimman standardit: Kudosprosessointi tehtiin kaikille kudoksille yhtä aikaa. Kaikki parafiinileikkeet leikattiin samalla vesiliukumikrotomilla samalla nopeudella. Värjäysprosesseissa kukin yksittäinen virhelähde tehtiin jokaisesta kudoksesta samana päivänä samalla värjäyskerralla. Kaikki leikkeet kuvattiin samalla mikroskoopilla ja kameralla ja jokaisella kudoksella oli oma valotuksensa virhelähteestä riippumatta. Työprosessin suunnittelin tarkkaan päiväkohtaisesti, jotta työn suoritus etenisi suoraviivaisesti.

Konevärjäystyö pisteessä värjäyksiin käytettyjen liuosten vaihtamisesta pidetään kirjaa. Havaintojeni mukaan Schiffin reagenssin toimivuus testataan konevärjäyspisteessä päivittäin, mutta testaamista ei kirjata tehdyksi työksi. Vaikka Schiffin reagenssin vanheneminen onkin hyvin epätodennäköistä ja reagenssi säilyy hyvin melko pitkäänkin, sen toimivuuden testaaminen voisi olla hyvä kirjata tehtyihin töihin.

Työni käsittelee histologisten peruskonevärjäysten yleisimpiä virhelähteitä. Histologian prosessissa on kuitenkin myös muita virhelähteiden mahdollisuuksia. Tällaisia virhelähteitä voisivat olla esimerkiksi kudoksen huono fiksoituminen tai leikkeeseen liittyvät fyysiset virhelähteet kuten kudosleikkeiden ruttuisuus tai ilmakuplat.

Muita virhelähteiden mahdollisuuksia voisi löytyä histologisissa värjäyksissä, jotka tehdään käsin ilman automaatiota.

Histologisten perusvärjäysten teoriaa ei ole kovinkaan paljon saatavilla ja suurin osa resepteistä on vanhoja. Valmistamani opetusmateriaali ja tämä opetusmateriaalia tukeva raportti kokoaa yhteen viiden yleisimmän histologisen perusvärjäyksen värjäysteorian auttamaan histologisten värjäysten ymmärtämistä ja sitä miksi värjäysten virhelähteet eroavat kontrollivärjäyksistä. Opetusmateriaalissa olen pyrkinyt ottamaan huomioon erilaisilla tavoilla oppivia oppijoita.

7 Kirjallisuutta

Aakko, Sanna 2012. Bioanalytiikka. HUSLAB, patologian keskuslaboratorio 1. Helsinki. Haastattelu 13.7.

Avwioro, G. 2011. Histochemical uses of haematoxylin – a review. JPCS 1. 24-34.

Bancroft J D - Gamble M (2008). Theory and practise of histological techniques. Elsevier Limited, 6. painos.

Barcia JJ (2007). The Giemsa stain: its history and applications. International Journal of Surgical Pathology 15 (3). 292-296.

Eberhardt Kirsi 2012. Bioanalytiikka. HUSLAB, patologian keskuslaboratorio 2. Helsinki. Haastattelu 13.7.

Ellis R. 2012. Giemsa's Staining Protocol for Tissue Sections. Verkkodokumentti < http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/giemsa_ellis.htm >. Luettu 12.9.2012

Eltoum I-E., Fredenburgh J., Myers R.B., Grizzle W.E. (2001b). Introduction to the theory and practise of fixation of tissues. Journal of Histotechnology 24:173-210.

Erilisten oppijoiden liitto. 2013. Verkkodokumentti < http://www.erilaistenoppijoidenliitto.fi/?page_id=158 >. Luettu 6.1.2013.

Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., Roller P.P. (1985). Formaldehyde fixation. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 33:845-853.

Grizzle W.E., Fredenburgh J. (2001). Avoiding biohazards in medical, veterinary and research laboratories. Biotechnic and Histochemistry 76:183-206.

Labquality. 2010. Histopatologian värjäystekniikka: kierroskalaute. Verkkodokumentti < <http://labquality-fi-bin.directo.fi/@Bin/227ad8389b1b3d7462a2ca29cb8633ad/1357969796/application/pdf/2028783/Labquality2010a.pdf> >. Luettu 12.1.2013.

HUS. 2012. Patologia. Verkkodokumentti < <http://www.hus.fi/default.asp?path=1,32,660,548,644,3738> >. Luettu 7.8.2012

HUSLAB. 2012. Konevärjäysten työhjeet.

HUSLAB. 2012. Gastroskopianäytteiden histologinen tutkimus. Verkkodokumentti < <http://HUSLAB.fi/ohjekirja/9054.html> >. Luettu 7.8.2012

Jyväskylän yliopisto. 2013. Oppimisen eri tyylit ja strategiat. Verkkodokumentti < <https://koppa.jyu.fi/avoimet/mit/oppimisesta-ja-opettamisesta/oppimisen-eri-tyylit-ja-strategiat> >. Luettu 6.1.2013.

- Kok L.P., Visser P. E., Boon M., E. (1988). Histoprocessing with the microwave oven: an update. *The Histochemical Journal* 20. 323-328.
- Lillie R.D., Tracy R.E., Pizzolato P., Donaldson P.T., Reynolds C. (1980). Differential staining of collagen types in paraffin sections: A color change in degraded forms *Virchows Archiv* 386: 153-159.
- Londesborough A., Pekkarinen-Kouki M., Salama A., Tähkä K. (2004). *Histologisen tekniikan perusteet*. Helsingin yliopisto.
- Munkholm J., Talman M-L., Hasselager T. (2008). Implementation of a new rapid tissue processing method – Advantages and challenges. *Pathology reasearch and practise* 204. 899-904.
- Otala, L. (1999). *Osaajana opintillä: Opas elinikäisen oppimisen matkalle*. WSOY
- Prento P. (2001) A contribution to the theory of biological staining based on the principles for structural organization of biological mecomolecules. *Biotechnic and Histochemistry* 76:137-161.
- Puchtler H., Meloan S., Brewton B.R. (1974). On the binding of Schiff's reagent in the PAS reaction: Effects of molecular configuration in models. *Histochemistry* 40. 291-299.
- Quintero-Hunter I., Grier H., Muscato M. (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic and Histochemistry*. 169-172.
- Rogers J. (2004). *Aikuisoppiminen*. Tampere: Tammer-Paino Oy. 37
- Rohr L.R., Lester M.D., Layfield M.D., Wallin D., Hardy D. (2001). A Comparison of Routine and Rapid Microwave Tissue Processing in a Surgical Pathology Laboratory Quality of Histologic Sections and Advantages of Microwave Processing. *American Journal of Clinical Pathology* 115 (5). 703-708.
- Sakura (2012). Verkkodokumentti < <http://www.sakura-americas.com/products/xpress-x120.html> >. Luettu 14.1.2013.
- Scott J. (1996). Alcian blue. Now you see it, now you don't. *European journal of oral sciences* 104. 2-9.
- Scott J., Quintarelli G., Dellovo M. (1964). The chemical and histochemical properties of alcian blue. I. The mechanism of alcian blue staining. *Histochemie* 4: 73-85.
- Suomen virtuaali yliopisto. solunetti. 2006. Kiinnittäminen eli fiksaus. Verkkodokumentti < <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/fiksaus/> >. Luettu 7.8.2012.
- Stainsfile. 2005. Herovici's Stain for Young and Mature Collagen. Verkkodokumentti. < <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/conektv/herovici.htm> >. luettu 1.11.2012.
- Stainsfile. 2005. Metanil yellow. Verkkodokumentti. < <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/13065.htm> >. Luettu 1.12.2012.

Stainsfile. 2005. Van Gieson for collagen. Verkkodokumentti. < <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/conektv/vangies.htm> >. Luettu 1.12.2012.

Stainsfile. 2005. Weigert's iron hematoxylin. Verkkodokumentti. < <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/hematoxylin/iron/weigert.htm> >. Luettu 30.11.2012.

The Internet Pathology Laboratory for Medical Education: Histotechniques. Verkkodokumentti. < <http://medlib.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTO.html> >. Luettu 20.10.2007.

UK Labs Direct LTD. 1013. Verkkodokumentti. < http://www.uklabs-direct.co.uk/html/used_histology.html >. Luettu 14.1.2013.

Willis, Donna – Minshew, Jan 2002: Microwave Technology in the Histology Laboratory. Histologic – Technical Bulletin for Histotechnology No.1. 1-5.

Wolf D., Kuhlmann M.D. 2006. Romanowsky-Giemsa staining. Verkkodokumentti. < http://www.immunologie-labor.com/cellmarker_files/IET_histostain_06.pdf >. Luettu 13.11.2012.

Käytetty kemikaali	Kemikaalin valmistaja
Etikkahappo	Riedel-de Haen
Suolahappo	Merck
Perjodihappo	VWR/BDH
Schiff	Merck
Mayerin hematoksyliini	HUSLAB liuoslaboratorio
Alcian Blue	Chroma
Hematoksyliini	Merck
Ferrikloridi	Yliopiston apteekki
Litiumkarbonaatti	HUSLAB liuoslaboratorio
Metanil yellow	Aldrich
Giemsa-liuos	Merck
Etanoli	Altia
Ksyleeni	Oy AFF-Chemicals ab
Pikropolykromiliuos	HUSLAB liuoslaboratorio

HE-värjäyksen kanta ja käyttöliuokset:
Kantaliuos 1: eosini
Kantaliuos 2: Mayerin hematoksyliini
Käyttöliuos 1: eosini
Käyttöliuos 2: HCl-liuos
Käyttöliuos 3: Mayerin hematoksyliini
PAS-värjäyksen käyttöliuokset:
Käyttöliuos 1: Perjodihappo
Käyttöliuos 2: Schiff
Käyttöliuos 3: Mayerin hematoksyliini
AB-PAS-värjäyksen käyttöliuokset:
Käyttöliuos 1: Alcian Blue
Käyttöliuos 2: Perjodihappo
Käyttöliuos 3: Schiff
Käyttöliuos 4: Mayerin hematoksyliini
Herovici-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset:
Kantaliuos 1: 10 % Weigertin hematoksyliini
Kantaliuos 2: Weigertin A-liuos
Kantaliuos 3: Weigertin B-liuos
Käyttöliuos 1: 10 % Weigertin hematoksyliini
Käyttöliuos 2: Metanil yellow
Käyttöliuos 3: Hapan differointiliuos
Käyttöliuos 4: Emäksinen differointiliuos
Käyttöliuos 5: Pikropolykromi
Käyttöliuos 6: Etikkahappo
Giemsa-värjäyksen kanta- ja käyttöliuokset:
Kantaliuos 1: Giemsa-liuos
Käyttöliuos 1: Giemsa-liuos

HE-värjäyksen protokolla

1. Kudoksen kiinnitys kuivausasemalla
2. Ksyleeni
3. Ksyleeni
4. Ksyleeni
5. Absoloitu etanoli
6. Absoloitu etanoli
7. 96 % etanoli
8. 96 % etanoli
9. 50 % etanoli
10. Aqua
11. Mayerin hematoksyliini
12. Hanavesi
13. HCl-differointi
14. Hanavesi
15. Eosiini
16. 96 % etanoli
17. 96 % etanoli
18. Absoloitu etanoli
19. Absoloitu etanoli
20. Absoloitu etanoli
21. Absoloitu etanoli
22. Ksyleeni

PAS-värjäyksen protokolla

1. Kudoksen kiinnitys kuivausasemalla
2. Ksyleeni
3. Ksyleeni
4. Absoloitu etanoli
5. Absoloitu etanoli
6. 96 % etanoli
7. 96 % etanoli
8. 50 % etanoli
9. Hanavesi
10. Perjodihappo
11. Hanavesi
12. Aqua
13. Schiff
14. Hanavesi
15. Mayerin hematoksyliini
16. Hanavesi
17. 96 % etanoli
18. 96 % etanoli
19. Absoloitu etanoli
20. Absoloitu etanoli
21. Absoloitu etanoli

AB-PAS-värjäyksen protokolla

1. Kudoksen kiinnitys kuivausasemalla
2. Ksyleeni
3. Ksyleeni
4. Absoloitu etanoli
5. Absoloitu etanoli
6. 96 % etanoli
7. 96 % etanoli
8. 50 % etanoli
9. Hanavesi
10. Alcian Blue
11. Hanavesi
12. Perjodihappo
13. Hanavesi
14. Aqua
15. Schiff
16. Hanavesi
17. Mayerin hematoksyliini
18. Hanavesi
19. 96 % etanoli
20. 96 % etanoli
21. Absoloitu etanoli
22. Absoloitu etanoli
23. Absoloitu etanoli

Herovici-värjäyksen protokolla

1. Kudoksen kiinnitys kuivausasemalla
2. Ksyleeni
3. Ksyleeni
4. Absoloitu etanoli
5. Absoloitu etanoli
6. 96 % etanoli
7. 96 % etanoli
8. Weigertin hematoksyliini
9. Hanavesi
10. Metanil yellow
11. Hapan etikkahappokäsittely
12. Emäksinen litiumkarbonaattikäsittely
13. Pikropolykromikäsittely
14. 1 % Etikkahappo
15. 96 % etanoli
16. 96 % etanoli
17. Absoloitu etanoli
18. Absoloitu etanoli
19. Absoloitu etanoli

Giemsa-värjäyksen protokolla

1. Kudoksen kiinnitys kuivausasemalla
2. Ksyleeni
3. Ksyleeni
4. Ksyleeni
5. Ksyleeni
6. Ksyleeni
7. Ksyleeni
8. Absoloitu etanoli
9. Absoloitu etanoli
10. Absoloitu etanoli
11. Absoloitu etanoli
12. 96 % etanoli
13. 96 % etanoli
14. 50 % etanoli
15. Hanavesi
16. Giemsa
17. Giemsa
18. Giemsa
19. Giemsa
20. 96 % etanoli
21. Absoloitu etanoli
22. Absoloitu etanoli
23. Absoloitu etanoli
24. Ksyleeni
25. Ksyleeni
26. Ksyleeni