

**STADIA**

HELSINGIN AMMATTIKORKEAKOULU

---

# **Sytosentrifugivalmisteiden Papanicolaou-värjäyksen optimointi**

Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa

Bioanalytiikan koulutusohjelma,  
bioanalytikko  
Opinnäytetyö  
12.11.2007

---

Sanna Iivonen  
Karoliina Routa



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Sanna Iivonen, Karoliina Routa			
Työn nimi			
Sytosentrifugivalmisteiden Papanicolaou-värjäyksen optimointi			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Syky 2007	64 + 6 liitettä	
<p><b>TIIVISTELMÄ</b></p> <p>Papanicolaou-värjäys on hematoksyliini-eosiinivärjäyksen pohjalta kehitetty erikoisvärjäys sytologisille näytteille. Värjäyksestä on olemassa monia erilaisia variaatioita. Jokainen laboratorio joutuu kehittämään oman värjäysohjeensa, koska värjäystulokseen vaikuttavat monet eri tekijät kuten vesijohtoveden pH.</p> <p>Opinnäytetyömme tarkoituksena oli kehittää optimaalisen värjäystuloksen antava Papanicolaou-värjäysohjelma sytosentrifugivalmisteille HUSLABin Jorvin sairaalan patologian laboratorioon ilman ammoniakki-alkoholi-sinistysliuosta. Aikaisempien kokeilujen perusteella sen oli todettu aiheuttavan muihin koneen luoksiin haitallisesti vaikuttavia höyryjä. Näyttemateriaaleiksi valitsimme virtsa-, pleuraneste-, bronkus-, ja ohutneulabiopsianäytteitä, joista teimme sytosentrifugivalmisteita.</p> <p>Työn lähtökohtana oli värjäysohjelma, jolla sytosentrifugivalmisteita oli aiemmin yritetty värjätä. Kehitimme ohjelmaa muuttamalla yhtä muuttujaa kerrallaan eli muutimme väri- ja alkoholiliuosajkoja sekä kokeilimme differentaation ja sinistyksen vaikutusta. Jokaisen ohjelman jälkeen preparaattit mikroskopoitettiin, jotta seuraavaa ohjelmaa osattiin kehittää oikeaan suuntaan. Ohjelmia kehitettiin yhteensä 15 ja ne aakkostettiin kirjaimilla A-O.</p> <p>Työtämme ohjanneet esitarkastaja ja patologi arvioivat arviointikaavakkeen avulla yhdeksän viimeistä värjäystä. He valitsivat niiden värjäysten joukosta kolme värjäystä, jotka annettiin kahdelle muulle esitarkastajalle ja kahdelle patologille arvioitavaksi. Syötimme tulokset SPSS-tilasto-ohjelmaan ja laskimme värjäyksien saamille pisteille keskiarvot. Suurimman pistekeskiarvon sai O-ohjelma, jonka valitsimme sen perusteella parhaaksi eli optimaalisen värjäystuloksen antavaksi ohjelmaksi.</p> <p>Suosittellemme O-ohjelmaa käyttöönotettavaksi Jorvin sairaalan patologian laboratorioon. Laboratoriosta löytyvät kaikki muut tarvittavat reagenssit ja välineet, paitsi Scott's Tap Water-sinistysliuoksessa tarvittava natriumbikarbonaatti. Muuten ohjelma on täysin käyttövalmis.</p>			
Avainsanat			
Papanicolaou-värjäys, hematoksyliini, differentaatio, sinistys			



Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors			
Sanna Iivonen and Karoliina Routa			
Title			
The Optimal Papanicolaou Staining Programme for Cytocentrifuge Preparations			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Autumn 2007	64 + 6	
<p>ABSTRACT</p> <p>Papanicolaou staining method is a special stain based on the routine hematoxylin-eosin stain. Many factors affect the staining result so modifications of the technique vary because each laboratory has to develop their own staining method.</p> <p>The goal of our final project was to develop a Papanicolaou staining programme for the pathology laboratory of HUSLABs Jorvi hospital that would stain the cytocentrifuge preparations in an optimal way. We could not use an ammonia-alcohol blueing solution because in earlier studies it had produced vapours which had damaged the other solutions in the machine. We used four sample types: urine, pleural fluid, fine needle aspirations and bronchi brushings and washings.</p> <p>Our project was based on the original programme which was used in earlier attempts to stain the cytocentrifuge preparations. We developed our programme by modifying one step at a time. Those steps were the duration of the staining and alcohol rinses, differentiation and blueing. After the staining was finished we microscoped the preparations and developed a new programme based on the knowledge of the previous one. In the end we had 15 programmes named alphabetically from A to O.</p> <p>By using an evaluation form our tutors evaluated nine programmes and chose three programmes for two screeners and two pathologists to evaluate. We analysed the results by using the SPSS-programme and counted the mean values to the programmes. The program O got the highest score and based on that fact we chose it to be the best. In other words it is the programme which gives the optimal staining result.</p> <p>We recommend that the programme O should be taken to use in the pathology laboratory of Jorvi hospital. All the reagents and equipment can be found in the laboratory except the sodiumbicarbonate needed for Scott's Tap Water blueing solution. Otherwise the programme is ready to use.</p>			
Keywords			
Papanicolaou staining method, hematoxylin, blueing solution, differentiation			

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 SYTOLOGINEN DIAGNOSTIIKKA	3
3 SYTOLOGISET NÄYTEMATERIAALIT JA NIIDEN KÄSITTELY	4
3.1 Virtsan irtosolututkimus	4
3.2 Bronkuseritteen irtosolututkimus	5
3.3 Pleuranesteen irtosolututkimus	6
3.4 Ohutneulabiopsianäytteet	7
3.5 Näytteiden valmistaminen sytosentrifugitekniikalla	8
4 PAPANICOLAOU-VÄRJÄYS	10
4.1 George Papanicolaou ja värjäyksen historiaa	10
4.2 Värjäyksen yleistä teoriaa	11
4.2.1 Näytteen esikäsittely	12
4.2.2 Papanicolaou-värjäyksen periaate	13
4.2.3 Hematoksyliini	15
4.2.4 Progressiivinen ja regressiivinen värjäystekniikka	17
4.2.5 Sinistäminen	18
4.2.6 Sytoplasmavärit	19
4.2.7 Alkoholisarjat	21
4.2.8 Preparaattien peittäminen	22
4.3 Liuosten säilytys ja huolto	22
4.4 Muita värjäyksen laatuun vaikuttavia tekijöitä	23
4.5 Kontaminaation välttäminen	24
4.6 Uusia versioita Papanicolaou-värjäyksestä	25
5 LAITTEIDEN TOIMINTA- JA KÄYTTÖPERIAATTEET	27
5.1 Sakura Autosmear TM Sytosentrifugi	27
5.2 Medite TST 40 - Värjäysautomaatti	28
6 TUTKIMUSONGELMAT	29
7 TUTKIMUKSEN ETENEMINEN	30
7.1 Näyttemateriaalin valinta	30
7.2 Preparaattien valmistaminen	32
7.3 Alkuperäinen värjäysohjelma ja sen kehittäminen	33

7.4 Tumaväriajan muuttaminen	35
7.5 Laskevan alkoholinsarjan tehostaminen	35
7.6 Sytoplasmavärien vaikutus värjäytyvyyteen	36
7.7 HCl-alkoholidifferentaatio	37
7.8 Alkoholihuuhtelut ja nouseva alkoholisarja	38
7.9 Sinistyksen tehostaminen	39
<b>8 VÄRJÄYSTULOKSET JA NIIDEN TULKINTA</b>	<b>41</b>
8.1 Värjäystulosten arviointi	41
8.2 Värjäystulosten paraneminen tutkimuksen edetessä	44
8.3 Värjäysohjelmien pisteet arviointikriteeri- ja näyttemateriaalikohtaisesti.	46
8.4 Parhaan ohjelman valinta	49
8.5 Värjäyksien sanalliset arviot	51
8.6 Värjäytyvyyden arvioinnin subjektiivisuus	52
8.7 Värjäystulosten yhteenveto	53
<b>9 TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS</b>	<b>54</b>
<b>10 POHDINTA</b>	<b>56</b>
<b>KIRJALLISUUS</b>	<b>60</b>
<b>LIITTEET</b>	

## 1 JOHDANTO

Papanicolaou-värjäystä on käytetty sytologisten näytteiden tutkimiseen jo vuodesta 1939 alkaen. Värjäyksen toiminta perustuu värjättävien solujen kemiallisiin ja morfologisiin eroihin. Papanicolaou-värjäyksessä käytetään tumaväriä, joka sitoutuu peitta-aineen avulla happamiin tumarakenteisiin. Tumaväriin vastaväreinä käytetään kahta sytoplasma- väriä, joiden tehtävänä on värjätä solujen sytoplasmisia rakenteita. Tumaväri värjättyvät sinisen eri sävyillä ja sytoplasmat joko oranssin, vaaleanpunaisen tai vihreän eri sävyillä. Värjäyksestä on kehitelty useita erilaisia variaatioita ja värisävyt vaihtelevat erilaisten variaatioiden mukaan. Nykyään Papanicolaou-värjäys on suosituin sytologinen värjäysmenetelmä. (Couture – Hafer 2004: 24–28.)

Papanicolaou-värjäys voidaan suorittaa joko käsin tai käyttämällä värjäysautomaattia. Patologian laboratoriot ovat ottaneet käyttöön automaattisia värjäysmenetelmiä kasvavalla vauhdilla. Teknologian kehitys on vaikuttanut värjäysautomaattien ominaisuuksiin; ne pystyvät suorittamaan koko ajan teknisesti vaativampia prosesseja. Koneella voidaan lisäksi käsitellä paljon suurempia näytemääriä kerralla ja sen avulla saadaan aikaan tasaisempia värjäystuloksia kuin käsivärjäystä käyttämällä. Konevärjäys vähentää myös värjäyksessä käytettävien reagenssien käyttöä sekä kontaminaatoriskiä. (Earle 2000: 30.)

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriin kuuluvassa Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa värjätään gynekologisia irtosolunäytteitä Medite-TST-värjäysautomaatilla, mutta sytosentrifugivalmisteita värjätään edelleen käsin, vaikka värjäysautomaatti soveltuisi hyvin myös niiden värjäämiseen. Sytosentrifugivalmisteiden värjäämistä on yritetty siirtää koneelle, mutta värjäysohjelmassa käytetty ammoniakki-alkoholisivistysliuos aiheutti koneen sisälle ilmeisesti muihin liuoksiin haitallisesti vaikuttavia höyryjä, jolloin gynekologisten irtosolunäytteiden värjäytyminen heikkeni. Laboratorion henkilökunnalla ei ole ollut tarpeeksi aikaa kehittää uutta ohjelmaa, joten laboratoriossa siirryttiin takaisin käsivärjäysmenetelmän käyttöön.

Jorvin sairaalan patologian laboratorion apulaisosastonhoitaja Kaija Halonen ja sytologian esitarkastaja Pirjo Nuorluoto ehdottivat optimaalisen värjäysohjelman kehittämistä

meille opinnäytetyön aiheeksi. Työ on tärkeä laboratorion henkilökunnalle, koska sytosentrifugivalmisteiden värjäyksen siirtäminen värjäysautomaattiin helpottaisi ja nopeuttaisi näytteidenkäsittelyprosessia. Värjäyksen automatisointi vapauttaisi henkilökuntaresursseja muuhun käyttöön ja säästäisi näin aikaa. Sopivan ohjelman löytäminen ei ole kuitenkaan aivan yksinkertaista. Papanicolaou-värjäykseen liittyy niin paljon lopputulokseen vaikuttavia tekijöitä, että sitä ei voi siirtää esimerkiksi suoraan laboratorios- ta toiseen, vaan toimiva värjäysohjelma täytyy kehittää aina laboratoriokohtaisesti ko- keilemalla. Värjäystulokseen vaikuttavat merkittävästi muunmuassa näytteiden otossa ja käsittelyssä käytetyt menetelmät, erot värjäysautomaattien ominaisuuksissa sekä vesi- johtoveden pH:ssa. (Mattila 1997: 1–2 ; Wittekind 2003: 264.)

Kaija Halonen ja Pirjo Nuorluoto toivoivat opinnäytetyömme tuovan myös mahdolli- simman paljon teorian tietoa värjäyksestä henkilökunnan käyttöön, joten käsittelemme työn teoriaosuudessa Papanicolaou-värjäystä laajasti sekä kerromme hieman aiheeseen liittyvistä uusista tutkimuksista. Työn laajuuden vuoksi, teemme yksityiskohtaisen sisäl- lysluettelon työhön, jotta tarvittavan tiedon etsiminen olisi helppoa.

Pyrimme kehittämään värjäysohjelman, jolla saadaan aikaan optimaalinen värjäystulos, erilaisten värjäyskokeilujen kautta. Ennen tutkimuksen empiiristä vaihetta perehdymme Papanicolaou-värjäyksen teoriaan, minkä jälkeen lähdemme suorittamaan työn empiiris- tä vaihetta. Työmme lähtökohtana on laboratoriossa aikaisemmin käytetty värjäysoh- jelma. Aikaisempien kokeilujen perusteella uusi ohjelma pitää kehittää ilman ammoni- akki-alkoholi-sinistysliuosta. Kun olemme kehittäneet riittävän monta hyvän värjäystu- loksen antavaa ohjelmaa, valitsemme niistä parhaan patologi- ja esitarkastajien visuaa- lisen arvion perusteella.

Papanicolaou-värjäystä käytetään useiden erilaisten sytologisten näyttemateriaalien vär- jäämiseen ja sen vuoksi otamme tutkimukseen mukaan erilaisia näytteitä, jotta värjäys- kokeilujemme toimivuutta voidaan arvioida mahdollisimman laajasti. Valitsemme tut- kimukseen mukaan yleisimpiä sytologisia näytteitä eli virtsa-, bronkuserite-, pleuran- este- ja ohutneulabiopsianäytteitä. Eri näytetyypit värjäytyvät hieman eri tavoilla, mutta optimaalisessa värjäysohjelmassa tulee kaikkien näyttemateriaalien värjäytyä niin hyvin, että jokaisesta voidaan tehdä värjäyksen avulla luotettavia sytologisia diagnooseja.

## 2 SYTOLOGINEN DIAGNOSTIIKKA

Kliininen sytologia on tautien diagnostiikkaa yksittäisten solujen tai soluryhmien mikroskooppisen tutkimuksen avulla. Sytologisten näytteiden yleisin indikaatio on pahanlaatuisen kasvaimen epäily kliinisen löydöksen tai oireiden perusteella. Sytologisista näytteistä arvioidaan solumorfologian perusteella, löytyykö potilaalta pahanlaatuisia muutoksia. Tutkimuksen avulla saadaan tietoa myös hyvänlaatuisista kasvaimista ja tulehduksista. Pahanlaatuisesta kasvaimesta voidaan tehdä alustava diagnoosi sytologisen tutkimuksen perusteella, mutta diagnoosi pyritään yleensä varmistamaan histologisesti. (Karttunen ym.2004: 282; Koivuniemi – Stenbäck 1994: 1–4; Timonen 1998: 81.)

Elimistössämme on yli 200 erilaista solutyyppiä. Osa niistä kuten epiteelisolut uusiutuvat jatkuvasti. Jatkuvasti uusiutuvan epiteelin pintasolukko irtoaa vanhetessaan itsestään, joten näitä soluja on helppo koota näytteeksi kehon eritteistä. Joissakin tapauksissa solujen irtoaminen itsestään on vähäistä, jolloin näyte otetaan harjaamalla tai huuhtelemalla. Nestetäyteisistä ruumiinoteloista tai nesterakkuloista sytologinen näyte voidaan ottaa neulalla ja ruiskulla. Kiinteästä elimestä saadaan otettua näyte ohuen neulan eli ohutneulabiopsian (ONB) avulla. (Timonen 1998: 81.)

Solujen rakennetta tutkitaan pääasiassa valomikroskooppisesti. Sen avulla voidaan erottaa solukalvo, tuma, sytoplasma ja suurella suurennuksella joitakin soluorganelleja. Solukalvon pinnalla voidaan nähdä sormimaisia ulokkeita, solujen välisiä siltoja tai värekarvoja. Tumasta erotetaan basofiilisesti värjäytyvä kromatiini sekä emäksisellä väriaineella värjäytyvä nukleoli. Tutkimusta varten solut on kiinnitettävä objektilasille, joko sivelytekniikalla tai sentrifugoimalla. Objektilasilla olevat solut on värjättävä, jotta ne näkyisivät hyvin valomikroskoopissa. (Karttunen ym.2004: 282–283; Koivuniemi – Stenbäck 1994: 2–4.)

Kliinisessä sytologiassa arvioidaan eri solutyyppien esiintymistä, solujen tumien koon sekä muodon vaihtelua, tuman värjäytyvyyttä, sytoplasma muutoksia, koko solua koskevia muutoksia kuten koon tai tuma-sytoplasma suhteen vaihtelua, solujen järjestäytymistä toisiinsa nähden sekä niiden degeneratiivisia muutoksia. Löydösten perusteella näytteet luokitellaan Papanicolaou-järjestelmän mukaisesti. Sytologisella irtosolututkimuksella onnistutaan diagnosoimaan 70–80 prosenttia pahanlaatuisista muutoksista. Ohutneulabiopsia- ja harjausnäytteiden luotettavuus on vielä parempi; niiden avulla to-



detaan 80–95 prosenttia pahanlaatuisista tapauksista. (Karttunen ym. 2004: 282–283; Koivuniemi ym. 2004: 8–9 ; 15–16.)

Sytologinen tutkimusmenetelmä on suhteellisen helposti ja nopeasti suoritettava sekä edullinen. Menetelmästä on erityisesti hyötyä, kun halutaan ottaa näyte elimestä, josta on vaikeaa tai mahdotonta ottaa histologista koepalaa. Sytologisten näytteiden avulla voidaan myös seurata eri hoitomuotojen vaikutusta potilaaseen. Menetelmän haittapuolia ovat väärät negatiiviset ja väärät positiiviset tulokset sekä epävarmat tulkinnat. Positiivisista löydöksistä 1–3 prosenttia on virheellisiä. Sytologisen menetelmän luotettavuuteen vaikuttaa näytteenottotekniikka, preparaatin valmistusmenetelmä, värjäyksen laatu ja esitarkastajan sekä patologin pätevyys. (Koivuniemi ym. 2004: 15–16.)

### 3 SYTOLOGISET NÄYTEMATERIAALIT JA NIIDEN KÄSITTELY

#### 3.1 Virtsan irtosolututkimus

Virtsanäyte otetaan irtosolututkimusta varten näytesarjana 3–5 peräkkäisenä päivänä. Virtsan rakossa oloajan tulisi olla lyhyt, jolloin soluja saadaan näytteeseen vähemmän, mutta ne ovat paremmassa kunnossa. Mitä kauemmin virtsa on ollut rakossa, sitä todennäköisemmin se sisältää degeneroitunutta materiaalia, mikä hankaloittaa näytteen tutkimista. Runsas juominen ja liikkuminen ovat suositeltavaa ennen näytteen antamista, koska ne edesauttavat solujen irtoamista. (HUSLAB 2007; Koivuniemi ym. 1994: 269–271; Whitaker - Williams 1994: 10.1–17.)

Tutkimus voidaan tehdä tuoreesta alle kaksi tuntia sitten otetusta virtsasta tai 50 - prosenttiseen alkoholiin fiksoidusta virtsasta. Fiksoidussa näytteessä on oltava yhtä suuri määrä alkoholia ja virtsaa. Virtsan irtosolututkimuksessa voi esiintyä munuaisista, munuaisaltaasta, virtsanjohtimesta, virtsarakosta ja virtsaputkesta peräisin olevia soluja sekä miehillä myös eturauhasesta, siemenrakkuloista ja siemenjohtimista. (Koivuniemi ym. 1994: 271–296; Laihola – Salminen 2001; Morse 2002: 625.)

Normaalitilassa virtsassa esiintyy vain vähän välimuotoisen epiteelin soluja eli uroteelisoluja. Pinnalliset uroteelisolut ovat runsas sytoplasmaisia, epäsäännöllisen muotoisia,

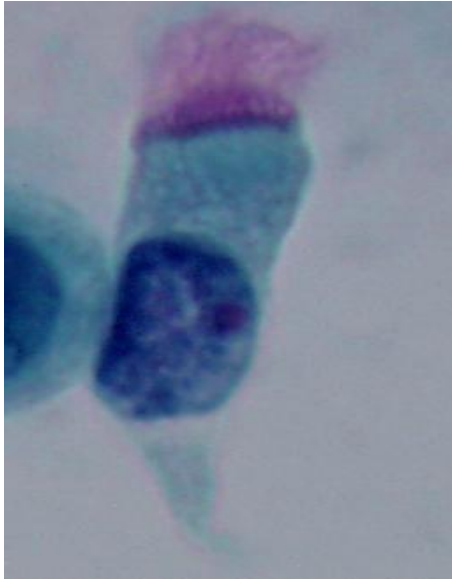
usein kulmiltaan pyörityneitä, ja osa saattaa olla monitumaisia. Syvempien kerrosten uroteelisolut ovat pienempiä, yleensä pyöreähköjä tai joskus kulmikkaita. Miehillä voi esiintyä näytteessä myös virtsaputken alaosan levyepiteelin pintasoluja, mutta levyepiteelin runsas esiintyminen erityisesti naisilla kertoo näytteen kontaminaatiosta, mikä on seurausta huonosta alapesusta ennen näytteenottoa. (Koivuniemi ym. 1994: 271–296.)

Normaalista näytteestä voi löytyä hieman neutrofiilejä ja erytrosyyttejä, mutta niiden runsaampi esiintyminen viittaa tulehdukseen. Tubulusten epiteelisolukkoa ei yleensä esiinny normaalissa virtsassa. Soluatyypia saattaa viitata hyvänlaatuisen tai pahalaatuisen muutokseen. Erilaisia soluatyypioita ovat esimerkiksi solujen koon suurentuminen, tumien koon ja muodon vaihtelu, tuma-sytolasmasuhteen muutokset, hyperkromasia ja kromatiinin kokkareisuus sekä suurentuneet nukleolit. Mitooseja ja solujen degeneraatiota saattaa myös esiintyä virtsanäytteessä. (Koivuniemi ym. 1994: 271–296.)

### 3.2 Bronkuseritteen irtosolututkimus

Bronkuseritenäytteissä solumateriaali on peräisin pääasiassa alemmista hengitysteistä. Alempia hengitysteitä ovat kurkunpää, henkitorvi, keuhkoputket (bronchukset), ilmatiehyet (bronkiolit) ja hengitystiehyet (bronchiolus respiratoriukset). Hengityselinnäytteet ovat teknisesti helposti otettavia. Nykyään yleisimmin käytössä oleva näyttemateriaali on bronkuserite. Aikaisemmin on käytetty paljon yskösnäytteitä, mutta niiden käyttö on vähentynyt, koska bronkuseritenäytteet ovat keuhkosityövän diagnostiikassa luotettavampia. (Bjälle 2002: 303–304; Taskinen 1994:143.)

Bronkuseritenäyte otetaan keuhkoputkien tähystyksen eli bronkoskopian yhteydessä. Näytteen tärkein indikaatio on diagnoosin lisäksi pahanlaatuisen muutoksen lokalisaation selvittäminen. Näyte voidaan ottaa joko huuhtelu- tai harjatekniikalla. Huuhtelunäyte otetaan ruiskuttamalla 5-10 millilitraa keittosuolaliuosta keuhkoihin ja aspiroimalla se takaisin. Harjairtosolunäyte otetaan taipuisalla harjalla, jolla kaavitaan soluja sekä epiteelinkappaleita kasvaimesta ja epäilyttävistä limakalvomuutoksista. Aspiroimalla otetut näytteet fiksoidaan välittömästi 95-prosenttiseen alkoholiin ja harjalla otetut näytteet fiksoidaan 50-prosenttiseen alkoholiin. (HUSLAB; Laihola – Salminen 2001 ; Taskinen 1994: 147–148 ; Tukiainen 2000: 234.)



KUVIO 1. Värekarvallinen lieriöepiteelisolu.

Bronkuseritenäytteessä esiintyy tyypillisesti runsaasti värekarvallisia lieriöepiteelisoluja. Lieriöepiteelisolut voivat olla myös värekarvattomia. Niiden sytoplasma kapenee basaaliosasta, ja uloimmassa leveässä päässä on tiivis päätelevy, johon värekarvat kiinnittyvät (ks. kuvio 1). Tuma on yleensä pyöreä ja tarkkarajainen. Terveellä henkilöllä voi olla vähän tai kohtalaisesti makrofageja. (Taskinen 1994: 151–220.)

Harjanäytteissä voi esiintyä verisyyttä, mutta näytteen tausta on normaalisti siistimpi kuin

yskösnäytteessä, koska näytteenottotekniikan avulla vältetään ylähengitystiekontaminaatio. Esimerkiksi kroonisen tulehduksen yhteydessä hengitystienäytteissä esiintyy lymfosyyttejä ja erilaisia soluttomia kappaleita, säikeitä tai juosteita. Tulehdus voi näkyä myös mikrobien, neutrofiilien tai eosinofiilien runsaana esiintymisenä. Epiteelisoluatypia on tyypillistä virusinfektioissa, mutta se voi olla merkki myös pahanlaatuisesta muutoksesta. (Taskinen 1994: 151–220.)

### 3.3 Pleuranesteen irtosolututkimus

Pleuranestenäyte luokitellaan effuusionäytteeksi. Effuusio tarkoittaa ylimääräisen nesteen kertymistä ruumiin seroosiseen onteloon. Pleura-onteloon kertyvää nestettä kutsutaan pleura-nesteeksi. Onteloiden neste on peräisin verenplasmasta, lukuun ottamatta joidenkin kasvainten erittämää limaa. Nestettä kertyy pleuraonteloon yleensä kasvaimen, trauman, tulehduksen, infektion ja hypoproteinemisen tilan kuten maksakirroosin, uremian tai sydäninsuffisienssin yhteydessä. Harvinaisempia syitä ovat yliherkkyysoireet, eräät lääkeainereaktiot ja kollageenisairaudet. Pleuranesteen sytologisen tutkimuksen tärkein indikaatio on pahanlaatuisen kasvaimen epäily. (Karttunen ym. 2005: 187, 249; Taskinen 1994: 297–299.)

Pleuranestenäyte otetaan aspiroimalla nestettä rintaontelosta neulan avulla. Näytettä otetaan yleensä 20 millilitrasta 50 millilitraan ja se laitetaan antikoagulanttia sisältävään näyteputkeen hyytymien muodostumisen välttämiseksi. Näyte fiksoidaan vasta laboratoriossa. Näytettä sentrifugoidaan tavallisella sentrifugilla 10 minuutin ajan kierrosnopeudella 1 600 kierrosta minuutissa (RPM), minkä jälkeen siitä imetään supernatantti pois. Näytteeseen lisätään 50-prosenttista alkoholia n. 3–6 millilitraa, minkä jälkeen sen annetaan fiksoitua rauhassa. (Laiholan ym. 2001; Whitaker – Williams 1994: 10.1.–12.)

Pleuraontelon nestekertymää on kahta eri tyyppiä: transudaatti sisältää niukasti proteiineja ja sen syntymisen syynä on yleensä verenkierron häiriö kuten sydäninsuffiensi. Eksudaatti sisältää paljon proteiineja ja sen syynä voi olla verisuonenseinämän vaurio esimerkiksi tulehduksen tai kasvaimen seurauksena. Eksudaatin mesoteelisoluisissa on usein reaktiivista vaihtelua, jopa selvää atypiaa sekä mitooseja ja solufagosytoosiakin saattaa esiintyä. Eksudaatin solukuvan arviointia voi häiritä runsas tulehdus- ja muu solukko sekä näytteen verisyys tai fibriini- ja proteiinikertymät. Akuuteissa tulehduksissa solukuvalla on tyypillistä runsas neutrofilia ja kroonisissa tulehduksissa lymfosytoosi. Eosinofiliaa voi esiintyä muunmuassa allergisissa reaktioissa ja kasvainten yhteydessä. (Karttunen ym. 2005: 187; Taskinen 1994: 299–303.)

Normaalisti pleuranesteessä esiintyy niukasti lymfosyyttejä ja vähän tai kohtalaisesti mesoteelisoluja sekä makrofageja. Yksittäiset mesoteelisolut ovat pyöreitä ja useimmiten yksitumaisia. Niiden koko vastaa suurin piirtein makrofagien kokoa. Tumakelmu on selvästi erottuva, kromatiini tasaista ja nukleolit ovat pieniä. Pleuraontelon effuusio saa aikaan seroosisten kalvojen mesoteelisolujen muodon pyöritymistä ja koon suurenmista sekä mesoteeliproliferaatiota. Proliferoituvat mesoteelisolut ovat usein kaksitumaisia. Onteloon kertyvän nesteen määrän lisääntyessä mesoteelisolujen ja solurykelmien irtoilu lisääntyy. (Taskinen 1994: 299–303.)

### 3.4 Ohutneulabiopsianäytteet

Ohutneulabiopsia tarkoittaa solunäytteen ottamista ohuella neulalla ja ruiskulla epäilyttävästä kudoksesta. Muutos on yleensä todettu jonkin muun tutkimusmenetelmän kuten palpaation, ultraäänitutkimuksen tai röntgenkuvauksen yhteydessä. Tavallisin tutkimuksen indikaatio on muutoksen pahanlaatuisuuden epäily, mutta myös tuleh-

duksellisissa, degeneratiivisissa ja hyperplastisissa prosesseissa voidaan saada ohutneulabiopsian avulla lisätietoa. Yleisimpiä punktiokohteita ovat rinta, maksa, kilpirauhanen, munuainen, iho, subkutis eli ihonalaiskudos, haima, keuhko, imusolmuke, perna ja sylkirauhanen. ( HUSLAB 2007; Koivuniemi 1994: 345.)

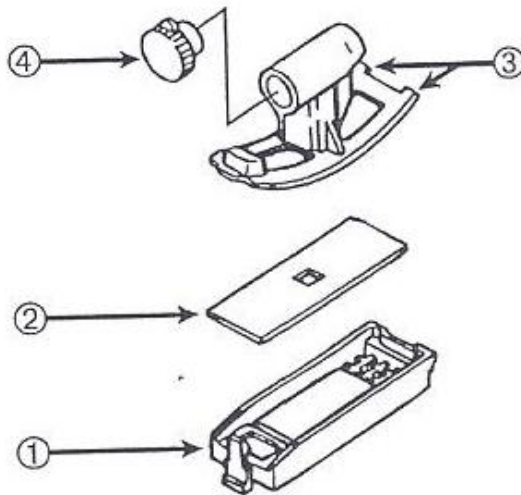
Näytteenottoneula ohjataan oikeaan kohtaan yleensä ultraäänitutkimuksen avulla, jos kohde sijaitsee syvällä. Neulaa liikutellaan nopeasti edestakaisin näytteenottokohdassa. Näytteenoton jälkeen ONB-saalis fiksoidaan välittömästi 2–5 millilitraan 50-prosenttista alkoholia. Ruisku pitää huuhdella huolellisesti fiksaationesteellä vetämällä alkoholiseosta ruiskuun 2–3 kertaa ja palauttamalla seos välittömästi takaisin näyteputkeen. (HUSLAB 2007; Koivuniemi 1994: 345.)

Ohutneulabiopsialöydökset vaihtelevat kohde-elimien mukaan. Esimerkiksi maksan normaalille solukuvulle on tyypillistä runsas maksasolujen eli hepatosyyttien ja verisolujen esiintyminen. Hepatosyyttien sytoplasma on eosinofiilistä ja tasaisen hienojyväistä. Sytoplasmassa näkyy joskus kellertävää tai ruskeaa pigmenttiä ja erikokoisia kirkkaita rasvavakuoleja. Tumat ovat pyöreitä, ja niissä näkyy yleensä pieni kirkkaansininen nukleoli. Näytteessä voi olla muitakin soluja kuten niukkasytoplasmaisia sappikapillaarien epiteelisoluja, jotka muodostavat tiiviitä ryhmiä ja isommista sappitiehyistä peräisin olevia korkeampia lieriöepiteelisoluja sekä maksan laskimosinusoidien sinusendoteelisoluja. Joidenkin monosyyttejä muistuttavien Kupffer-solujen esiintyminen on myös normaalia. Muutos kohde-elimien normaalissa solukuvassa saattaa viitata patologiseen tilaan. (Koivuniemi – Wasastjerna 1997: 523–525.)

### 3.5 Näytteiden valmistaminen sytosentrifugitekniikalla

Sytologisten näytteiden valmistamiseen käytetään nykyään useimmiten sytosentrifugitekniikkaa. Näytteen fysikaaliset ominaisuudet vaikuttavat valmistustekniikan valintaan. Sytosentrifugoinnin avulla näytteen solut saadaan konsentroitua suoraan objektilasille. Menetelmä on optimaalinen esimerkiksi, kun valmistetaan preparaatteja näytteistä, joissa on vähän solumateriaalia. Sentrifugointi maksimoi solujen konsentraatiota ja samalla solut saadaan kiinnitettyä objektilasille mikroskooppista tarkastelua varten. Sytosentrifugitekniikalla valmistettujen lasien värjäys sopii hyvin koneella tehtäväksi. (Whitaker - Williams 1994: 10.1 –13–14.)

Sytologisen preparaatin valmistaminen aloitetaan, joko kiinnittämällä tunnistetietotarra tai kirjoittamalla tunnistetiedot, puhtaalle 75 x 25 millimetrin kokoiselle aluslasille. Valmistuksessa käytetään kyvettä, joka koostuu neljästä eri osasta: pidikkeestä, rajaa- jasta tai filtteri-paperista, näytekammioista ja korkista (ks. kuvio 2). Tunnistetiedoilla va- rustettu lasi asetetaan kyvetin pidikkeeseen hiospään himmeä puoli ylöspäin. Lasin päälle asetetaan rajaaaja tai filtteri-paperi, joiden avulla sentrifugoinnin aikana lasille ker- tyvä solukerros saadaan rajattua tietylle alueelle ja solukerroksesta muodostuu yksiker- roksinen. Filtterin tehtävänä on myös absorboida itseensä supernatanttia. Näytekammio asetetaan pidikkeeseen lasin ja filtteri-paperin päälle. Tässä vaiheessa on tärkeää varmis- taa, että rajaaajan tai filtteri-paperin aukko on näytekammion aukon mukaisesti oikealla kohdalla. Näytekammioita tulee painaa niin kauan, että se lukittuu pidikkeeseen kunnol- la. (Bales 2006: 1586-1587; Sairtec Oy: 10–11.)



KUVIO 2. Pieni näyteky- vetti: Aluslasi ja pidike (1), filterpaperi (2), näyte- kammio (3) sekä korkki (4). (Mukaiillen Sakura työohje.)

Näytettä pipetoidaan tarvittava määrä näytekammioon. Näytemäärä valitaan arvioimalla näytteen laatua ja ulkonäköä silmämääräisesti. Mitä paksumpaa näyte on, sitä vähem- män tarvitaan näytettä riittävän solumäärän takaamiseksi objektilasille ja päinvastoin. Näytteen pipetoimisen jälkeen näytekammioon lisätään annostelijasta 0,5 millilitraa po- lyetyleeniglykolia eli PEG -fiksatiivia, jonka tehtävänä on muodostaa solujen ympärille vahamainen kerros, joka suojaa soluja vahingoittumiselta. PEG-fiksatiivi myös parantaa solujen kiinnittymistä objektilasille ja toimii ikään kuin solujen säilöntäaineena. (Morse 2002: 628–629; Laihola – Salminen 2001; Whitaker – Williams 1994: 10.1–3.)

Lopuksi näytekammio täytetään merkkiviivaan asti 50-prosenttisella alkoholilla, jonka tehtävänä on fiksoida näytteen solut. Näytekammioihin on merkitty tilavuudet merkki- viivoilla. Pienessä kyvetissä on 0,5 sekä 1 millilitran kohdalla merkkiviivat, keskikokoi-

sessä 6 millilitran kohdalla ja suurimmassa 12 millilitran kohdalla. Pienin kyvetti voidaan täyttää kumpaan tahansa merkkiviivaan asti, mutta kahdessa isommassa kyvetissä on vain yksi viiva, johon asti näytekammio on aina täytettävä. Kyvetiä ei saa ylitäyttää, koska silloin on vaarana näytteen sumuaminen sytosentrifuugin roottorikammioon, jossa näytteet ovat sentrifugoinnin aikana. (Laihola – Salminen 2001; Sairtec Oy:11–14; Morse 2002: 626–629.)

Näytteitä voidaan sentrifugoida eri nopeuksilla. Nopeuden valintaan vaikuttavat näytemateriaalin ominaisuudet sekä käytössä olevat objektilasit. Esimerkiksi gelatiinilaseja käytettäessä näytteitä sentrifugoidaan viiden minuutin ajan nopeudella 2 000 RPM. Sytosentrifugitekniikan ongelmia ovat muunmuassa solumateriaalin menetys filteripaperiin, mutta ongelma voidaan ehkäistä välttämällä näytekamion ylitäyttämistä sekä käyttämällä preparaatin valmistuksessa adhessiiveja kuten polyetyleeniglykolia. Objektilaseille voi olla myös lisätty ohut ja tasainen kerros esimerkiksi gelatiinia tai poly-L-lysiinia. Adhesiivit auttavat soluja kiinnittymään ja pysymään lasin pinnalla. (Laihola – Salminen 2001; Morse 2002: 628–629; Whitaker – Williams 1994:10.1–6; 10.1–14.)

## 4 PAPANICOLAOU-VÄRJÄYS

### 4.1 George Papanicolaou ja värjäyksen historiaa

George Nicholas Papanicolaou oli kreikkalainen lääkäri. Hän tuli tunnetuksi työstään kohdunkaulan syöpää vastaan. Hän kehitti papa-kokeena tunnetun gynekologisen irtosolutestin syövän esiasteiden toteamiseen. Testi otettiin rutiininomaisesti käyttöön vuonna 1939 New Yorkilaisessa sairaalassa, jossa Papanicolaou oli tutkijana. (Papanicolaou Society of Cytopathology 2004; Sigma-Aldrich Co 2007.)

Papanicolaou kehitti testiä varten Papanicolaou-värjäykseksi nimetyn erikoisvärjäyksen, joka mahdollisti paksujenkin gynekologisten irtosolunäytteiden tarkastelun. Värjäyksen avulla paksut näytteet saatiin läpikuultaviksi, yksityiskohtien näkyessä silti selkeästi. Värjäystekniikkaa on myöhemmin sovellettu gynekologisten irtosolunäytteiden lisäksi yleisen sytologian näytemateriaalien kuten esimerkiksi virtsan solujen diagnostiikassa. (Papanicolaou Society of Cytopathology 2004; Sigma-Aldrich Co 2007.)

Sytologisia näytteitä on perinteisesti arvioitu Papanicolaou-luokkien avulla (ks. taulukko 1). Papa-luokkia on viisi ja ne kuvaavat solujen pahanlaatuisuusastetta. Luokka yksi tarkoittaa normaalia solukuvaa, mutta luokkaan viisi mentäessä kyseessä on jo maligni muutos. Papa-luokkien avulla potilasta hoitava lääkäri saa nopeasti käsityksen tutkimustuloksesta. Lisäksi vastauksessa otetaan yleensä kantaa näytteen riittävyteen ja normaaliin solujen määrään näytteessä. Sytologiseen vastaukseen kuuluu myös arvio muutoksen luonteesta sekä ehdotus jatkotoimenpiteistä. (Rantala – Lounatmaa 1998: 86–87.)

TAULUKKO 1. Papanicolaou-luokat. (Mukaiillen Stenbäck – Koivuniemi 1994: 11.)

Papa-luokka	Tulkinta
0	Riittämätön tai pilaantunut näyte
I	Normaaleja soluja
II	Hyvänlaatuisia epänormaaleja soluja eli benigniä atypiaa
III	Lievästi maligniteetin suhteen epäilyttäviä solumuutoksia tai premalignia atypiaa
IV	Vahvasti maligniteetin suhteen epäilyttäviä eli vahvasti malignisuuspekteja soluja
V	Pahanlaatuisia eli maligneja soluja

#### 4.2 Värjäyksen yleistä teoriaa

Kudoksia ja soluja värjätään erilaisilla väriaineilla, jotta ne saataisiin näkymään valomikroskoopissa. Väriaine on värillistä, koska se absorboi sähkömagneettisen spektrin näkyvän valon aluetta, joka on aallonpituudeltaan noin 400–650 nm. Ihmissilmän näkemä väri syntyy niistä aallonpituuksista, jotka eivät ole absorboituneet väriaineeseen.



Esimerkiksi pikriinihappo absorboi aallonpituudeltaan lyhyttä, sini-violetta valoa näkyvän valon spektrin alkupäästä ja heijastaa keltaista valoa, kun taas hapan fuksia absorboi sini-vihreää valoa spektrin keskivaiheilta ja heijastaa punaista valoa. Väriaineen kykyyn värjätä kudoksia tai soluja vaikuttaa kudoksen tai solujen fiksaatio, värjättävän näytemateriaalin sekä värin pH, reaktioaika ja värin poistumisnopeus näytteestä. (Horobin 2002: 117.)

Affiniteetti tarkoittaa näytemateriaalin ja värin välistä vetovoimaa. Kun näytettä aletaan värjätä, fiksoidun näytteen ja värimolekyylin välille muodostuu elektrostaattinen sidos, joka vetää ne yhteen. Kyseessä on Coulombin voima, joka perustuu pH-arvoon. Emäkseen väriaineen positiivisesti varautuneet kationit ja happaman kudoksen negatiivisesti varautuneet anionit liimautuvat yhteen. Mitä suurempi varausero komponenttien välillä on, sitä suuremmalla voimalla ne kiinnittyvät toisiinsa. (Horobin 2002: 109–110.)

Värjäyksen reaktioaika vaikuttaa suuresti siihen, kuinka selektiivisesti näyte värjäytyy. Progressiivisella metodilla värjätessä värjäysaika on erittäin tarkka ja selektiivisyys saadaan esille aikaa rajoittamalla. Värjäysaikaa pidentämällä saadaan myös suurimolekyyliset hitaasti diffundoituvat väriaineet tunkeutumaan soluihin. Värjäystulokseen vaikuttaa myös värin poistumisnopeus. Väri katoaa ensin helposti läpäistävästä näytemateriaalista. Ei niin helposti läpäisevä materiaali sen sijaan säilyttää värinsä kauemmin. Regressiivinen värjäystekniikka hyödyntää värin selektiivistä poistamista differentaation avulla. (Horobin 2002: 113.)

#### 4.2.1 Näytteen esikäsittely

Näyte täytyy fiksoida ennen värjäämistä, jotta autolyysi eli näytemateriaalin tuhoutuminen saadaan pysäytettyä ja kudoksen tai solujen morfologia sekä rakenne mahdollisimman hyvin säilytettyä. Fiksaatio estää autolyysia inaktivoimalla soluja hajottavia entsyymejä ja tuhoamalla mikrobeja. Näyte on fiksoitava mahdollisimman pian, sillä solut kuivuvat suhteellisen nopeasti. Kuivuneiden solujen tumavärjäys saattaa jäädä epätäydelliseksi ja solut värjäytyä vain toisella sytoplasmavärillä. (Holliday 2004: 17; Mattila 1997: 1.)

Fiksaatioaineen valinnassa täytyy huomioida kyseessä oleva näytemateriaali, sillä erilaiset näytteet fiksoituvat eri tavalla. Näytemateriaalin lisäksi fiksaatioaineen valintaan

vaikuttaa tekniikka, jolla näytteestä valmistetaan ja värjätään mikroskopoitava preparaatti. Siksi histologisten ja sytologisten näytteiden fiksaatio poikkeaa toisistaan. Alkoholi- eli etanolifiksaatiota käytetään sytologiassa, koska solujen muoto säilyy parhaiten alkoholissa. Etanoli tunkeutuu nopeasti solukkoon ja poistaa veden. Sytoplasman ja tumman yksityiskohdat erottuvat etanolifiksaation ansiosta erinomaisesti mikroskopoitaessa. Fiksaatio on aina kompromissi näytteen säilyvyyden ja värjäysartefaktan suhteen, koska se muuttaa näytemateriaalin kemiallisia ominaisuuksia. Hyvää säilyvyyttä ei voida saavuttaa ilman, että fiksaatio aiheuttaa jonkin verran artefaktaalista värjäytymistä. (Horobin 2002: 114; Hopwood 2002: 75; Llewellyn 2005.)

#### 4.2.2 Papanicolaou-värjäyksen periaate

Papanicolaou-värjäys on hematoksyliini-eosiinivärjäyksen pohjalta kehitetty erikoisvärjäys sytologisille näytteille. Värjäyksessä on monia värjäystulokseen vaikuttavia tekijöitä, ja lähes jokainen laboratorio on kehittänyt värjäyksestä oman variaation. Värjäystulokseen vaikuttavat muun muassa tumaväriin valinta, sen konsentraatio ja käyttötapa, värjäysajat, differentaatio- tai sinistysliuosten käyttö, vesijohtoveden pH ja alkoholi-huuhtelut. Värjäyksen peruskaava on kuitenkin melko samanlainen kaikkialla. (Wittekind 2003: 264.)

Papanicolaou-värjäys alkaa 96-prosenttisesta etanolista (ks. taulukko 2), jonka jälkeen näytepreparaatit kuljetetaan 70- ja 50-prosenttisen etanolin kautta tumaväriin eli hematoksyliiniin. Ylimääräinen väri huuhdotaan pois juoksevalla vedellä, jonka jälkeen näytteet differentoidaan, jos käytetään regressiivistä menetelmää. Differentaatio pysäytetään toisella vesihuuhtelulla, minkä jälkeen näytteet sinistetään. Sinistyksen jälkeen näytepreparaatit kuljetetaan 70-, 80-, ja 96-prosenttisten etanolimaljojen kautta ensimmäiseen sytoplasmaväriin eli Orange G:hen (OG-6). Ylimääräinen väri huuhdotaan pois 96-prosenttisellä etanolilla ja preparaatit siirretään seuraavaan sytoplasmaväriin eli Eosin Azuren (EA). EA:n jälkeen ylimääräinen väri huuhdotaan taas pois 96-prosenttisellä etanolilla ja preparaatit kuljetetaan absoluuttisen alkoholimaljan kautta ksyleeniin, johon ne jäävät odottamaan peittämistä. (Bales 2006: 1593–1596.)

TAULUKKO 2. Papanicolaou-värjäyskaavio.

STEP nro.	Reagenssi	Aika
1	96 % etanoli	10:00
2	70 % etanoli	05:00
3	50 % etanoli	02:00
4	Aqua	00:15
5	<b>Tumaväri</b>	02:00
6	Juokseva vesi	03:00
7	<b>Differentiaatio</b>	00:02
8	Juokseva vesi	03:00
9	<b>Sinistys</b>	00:30
10	Aqua	02:00
11	70 % etanoli	02:00
12	80 % etanoli	02:00
13	96 % etanoli	02:00
14	<b>Syttoplasmaväri OG-6</b>	02:30
15	96 % etanoli	02:00
16	96 % etanoli	02:00
17	<b>Syttoplasmaväri EA</b>	02:30
18	96 % etanoli	02:00
19	96 % etanoli	02:00
20	Absoluuttinen etanoli	02:00
21	Ksyleeni	

Laboratorioiden värjäystulosten välillä voi olla suuriakin sävy- ja tummuusaste-eroja. Yleisestiottaen hyvänä värjäystuloksena kuitenkin pidetään sitä, että hematoksyliini värjää tuman tummansiniseksi ja tumakalvo, sekä tuman sisällä olevat komponentit näkyvät selkeästi. Hematoksyliinin käyttötavalla eli sillä, värjätäänkö progressiivisesti vai regressiivisesti ei ole lopputuloksen kannalta merkitystä. Papanicolaou-värjäyksestä puhuttaessa optimaalinen värjäystulos on katsojan silmässä. Jokainen laboratorio kehittää värjäyksestä oman versionsa niin, että näytteiden arvioijat eli patologit ja esitarkastajat ovat tyytyväisiä värjäystulokseen. (Aho 2000: 145; Bibbo 1991: 890; Millikin 2005.)

Jos värjäys on onnistunut, näytteen tausta ei ole värjäytynyt tai se on hyvin vaalean ruskea. Orange G värjää keratiinin kirkkaan oranssiksi (ks. taulukko 3) ja eosinofiilien granulat sekä pintakerroksen levyepiteelisolut asidofiilisesti, eli punasävyisesti. EA värjää aineenvaihdunnallisesti aktiivisten solujen, keskikerrossolujen, parabasaalisolujen ja lieriöepiteelisolujen sytoplasmat vihertäviksi. Lisäksi se värjää histiosyytit ja leukosyytit vihreiksi. EA:n sisältämä eosin yellowish värjää levyepiteelin pintasolut, punasolut ja värekarvat punaisiksi. (Aho 2000: 145; Bibbo 1991: 890; Millikin 2005.)

TAULUKKO 3. Näytteiden värjäytyminen Papanicolaou-värjäyksessä. (Aho 2000: 145; Bibbo 1991: 890; Millikin 2005)

Värjättävä kohde	Värjäystulos
Tuma	tummansininen
Eosinofiilien granulat	punasävyinen
Pintakerroksen levyepiteelisolut	punasävyinen
Keskikerrossolujen sytoplasmat	vihertävä
Lieriöepiteelisolujen sytoplasmat	vihertävä
Histiosyytit	vihreä
Leukosyytit	vihreä
Osa syöpäsoluista	vihreä
Erytrosyytit	punainen
Lieriöepiteelisolujen värekarvat	punainen

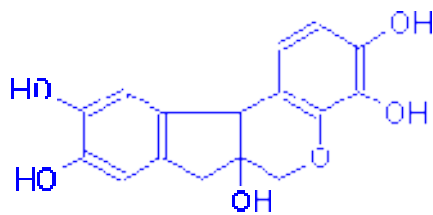
#### 4.2.3 Hematoksyliini

Hematoksyliini on luonnosta saatava väriaine. Sitä käytetään Papanicolaou-värjäyksessä tumien värjäämiseen. Hematoksyliinia valmistetaan tropiikissa kasvavan *Haematoxylum campechianum*-puun kaarnasta uuttamalla. Sitä käytettiin alun perin kankaiden värjäämiseen, mutta vasta kun peitta-aineiden käyttö keksittiin, väri saatiin pysymään vaatteissa. Histologit ovat myöhemmin hyödyntäneet tätä tietoa peitta-aineiden vaikutuksesta värjäytyvyyteen kehitellessään värjäyksiä kudosnäytteille. (Titford 2005: 74.)

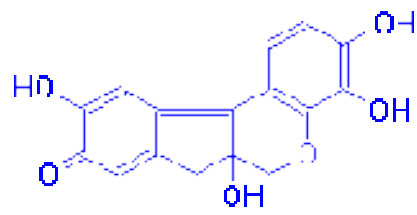
Hematoksyliini (ks. kuvio 3) ei ole valmis väriaine, koska sillä on huono affiniteetti kudokseen ja se on melko väritön. Hapettamalla hematoksyliini hemateiiniksi, saadaan aikaan väriaine. Värejä kuitenkin kutsutaan hematoksyliineiksi kirjallisuudessa, vaikka termi on hieman harhaanjohtava. Hapettaminen voidaan tehdä antamalla hematoksylii-

nin olla kosketuksissa valon ja ilman kanssa. Prosessia kutsutaan luonnolliseksi hapettamiseksi, ja se takaa värille pidemmän käyttöiän. Ongelma luonnollisessa hapettamisessa on menetelmän hitaus. Värin hapettaminen luonnollisesti voi kestää jopa 3–4 kuukautta. (Bancroft – Stevens 1980: 85; Bancroft – Cook 1984: 18.)

Kemiallinen hapetus on huomattavasti nopeampaa, mutta värin käyttöikä ei ole silloin yhtä pitkä. Mayerin ja Gillin hematoksyliini hapetetaan natriumjodaatilla ja Harrisin hematoksyliini elohopeaoksidilla. Hapetuksen seurauksena hematoksyliinistä tulee hemateiinia (ks. kuvio 4), joka on heikosti anioninen purppuranvärinen väriaine. (Bancroft – Cook 1984: 18.)



KUVIO 3. Hematoksyliinin kaava-kuva. (Mukaiillen Lillie 2005)



KUVIO 4. Hemateiinin kaava-kuva. (Mukaiillen Lillie 2005)

Hapan hemateiini ei pysty sitoutumaan riittävän voimakkaasti happamiin tumanrakenteisiin ja siksi väriaine vaatii toimiakseen vielä emäksisen peitta-aineen. Peitta-aineella on yhtä suuri affiniteetti niin kudokseen kuin väriinkin. Positiivisesti varautunut peitta-aine toimii siltana negatiivisesti varautuneen tuman ja negatiivisesti varautuneen värin välillä ja sitoo ne yhteen. Näin saadaan hapan tuma värjäytymään. (Baker 2005, Bibbo 1991: 888; Couture – Hafer 2004: 25.)

Jos peitta-aineena käytetään esimerkiksi alumiini, väriä sanotaan alumiinihematoksyliiniksi. Hematoksyliinit luokitellaan siis käytetyn peitta-aineen mukaan seuraavasti:

- Rautahematoksyliinit: Esim. Weigert, Heidenhein, Loyez, Verhoeff
- Alumiini hematoksyliinit: Harris, Mayer, Gill
- Muut hematoksyliinit: Peitta-aineena käytetään esim. lyijyä, metallisuoloja ja kaliumsulfaattia. Hematoksyliinia voidaan käyttää myös ilman peitta-aineita esimerkiksi mineraalien osoittamiseen. (Gamble – Wilson 2002: 126–134; Baker 2005; Bibbo 1991: 888; Couture – Hafer 2004: 25.)

Hematoksyliinit eroavat toisistaan värin, hematoksyliinikonsentraation, hapettimen, hapetuksessa käytetyn ajan, stabiiliuden ja liuoksen koostumuksen suhteen. Hematoksyliiniliuokset keksittiin pääasiassa kokeilemalla. Ilman kokeilujen tuomaa tietoa hematoksyliineista olisi vaikeaa kehittää toimivia väriaineita. (Wittekind 2003: 263.)

#### 4.2.4 Progressiivinen ja regressiivinen värjäystekniikka

Sopivan tumavärjäysajan valinta riippuu käytettävästä hematoksyliinista. Hematoksyliineilla voi värjätä kahdella eri tavalla: progressiivisesti tai regressiivisesti. Progressiivinen värjäys tarkoittaa, että hyvä värjäystulos saavutetaan rajoittamalla värjäysaikaa. Näytelasilla olevien solujen annetaan olla väriliuoksessa vain niin kauan, että sopiva tummuusaste saavutetaan. Regressiivisellä metodilla värjätessä näyte ylivärjätään tarkoituksella. Värjäystekniikka ei vaadi niin suurta tarkkuutta ajan suhteen kuin progressiivinen menetelmä. Riittää, että näyte ylivärjäytyy, minkä jälkeen optimaalinen värjäystulos saavutetaan differentaation avulla. (Millikin 2005; Bibbo 1991: 885; Couture – Hafer: 27.)

Väriaineen kykyyn värjätä joko regressiivisesti tai progressiivisesti vaikuttaa väriaineen konsentraatio. Progressiivinen väriaine on konsentraatioiltaan matala ja värjää hitaasti, jolloin värjättävä materiaali on mahdollista värjätä juuri sopivaan pisteeseen asti. Regressiivisessä värjäystekniikassa ylivärjäys johtuu väriaineen korkeasta konsentraatiosta, sen luonteesta värjätä aggressiivisesti ja pitkästä värjäysajasta. Hapan väriaine kiinnittyy ensin tiukasti emäksisiin kudoserakenteisiin, mutta ajan kuluessa se alkaa kiinnittyä myös happamiin rakenteisiin. (Bancroft – Stevens 1982: 95–107; Bibbo 1991: 885; Millikin 2005.)

Regressiivinen värjäystekniikka tarvitsee differentaation optimaalisen värjäystuloksen saavuttamiseksi, koska värjäystulos jää muuten likaiseksi, harmaan sävyiseksi ja epätarkaksi. Hematoksyliini differentoidaan yleensä laimealla suolahapolla, mutta melkein mikä tahansa muukin happo, joka liukenee 70-prosenttiseen etanoliin, sopii periaatteessa käytettäväksi differentaatioon. On hyvä muistaa, että käytetty happo on kuitenkin emäksistä suhteessa erittäin happamaan hematoksyliiniin. Happo on yleensä laimennettu alkoholiin, mutta teoriassa se voitaisiin yhtä hyvin laimentaa veteen. Veteen laimennettu happo differentoi tehokkaasti hematoksyliinia, mutta se myös ilmeisesti vaatii suu-

remman agitaation tasaisen värjäystuloksen saavuttamiseksi. Etanoli aiheuttaa ilmeisesti pyörteitä ja virtauksia sekoittuessaan veden kanssa ja tarvitsee siksi vähemmän agitaatiota. (Aho 2000: 144–145; Bales 2006: 1599–1600; Millikin 2005.)

Differentaation tarkoituksena on hajottaa heikot, samanmerkkistä varausta olevat värikudos-sidokset ja purkaa näin ylivärjäys, mutta se myös poistaa gelatiiniin sitoutuneen hematoksyliinin ja tekee taustasta kirkkaan läpinäkyvän. Hematoksyliinit, joita voidaan käyttää progressiivisesti, värjäävät harvoin taustaa huomattavasti ja siihen perustuu differentaation tarpeettomuus niiden kohdalla. Differentaatio saadaan pysäytettyä laittamalla näytepreparaatit juoksevaan veteen. Hypokromaattinen lopputulos, jolloin differentaatio on vienyt liikaa väriä, on tavallisempi ongelma kuin hyperkromaattinen tulos. Mikäli värjäystulos on kuitenkin hyperkromaattinen, se ilmenee heikompana kontrastina tuman ja sytoplasman välillä. Lisäksi sytoplasman värjäytyvyys heikkenee. Jos tulos on hypokromaattinen, tuma värjäytyy heikommin. (Aho 2000: 144; Bancroft – Stevens 1982: 95–107; Bibbo 1991: 885; Bales 2006: 1599–1600; Millikin 2005.)

#### 4.2.5 Sinistäminen

Tumavärjäyksen jälkeen, vuorossa on sinistys. Sinistyksen perusidea on muuttaa happamalla tumavärillä saatu punertava, asidofiilinen värjäystulos siniseksi. Väri pitää muuttaa, koska punainen väri ei ole pysyvä vaan liukenee hitaasti soluista objektilasin ja peitinlasin välissä olevaan väliaineeseen. Sinistämällä aikaan saatu väri on liukenematon ja pysyvä. Värin säilyvyyden lisäksi sinistämällä saadaan aikaan parempi tarkkuus ja kontrasti vastaväreinä toimivien sytoplasmavärien kanssa. (Llewellyn 2006.)

Sinistys perustuu vety-ioneihin. Happamassa hematoksyliiniliuoksessa vety-ioneita on paljon. Kun kudosta, johon hematoksyliini on sitoutunut, huuhdellaan emäksisellä liuoksella, vety-ioneja irtoaa ja väri muuttuu sinertäväksi. Sinistyksen nopeuteen vaikuttaa sinistävän aineen pH. Mitä suurempi pH, eli emäksisempi liuos, sitä nopeammin sinistys tapahtuu. (Bales 2006: 1593–1598; Milkin 2005.)

Sinistävänä aineena voidaan käyttää tavallista vesijohtovettä, kunhan se on emäksisempää kuin värjäyksessä käytetty tumaväriliuos. Vesijohtoveden pH on yleensä hieman hapanta (pH 6-7), mutta se on silti emäksistä verrattuna tumavärinä käytettyyn hema-

toksyliiniin, jonka pH on 2.6–2.9. Vesijohtoveden pH:n tulisi kuitenkin olla yli kahdeksan, jotta sinistys tapahtuisi tehokkaasti ja suhteellisen nopeasti. Jos veden pH on alle kahdeksan, voidaan sinistävä vaikutus saada aikaan kasvattamalla sinistykseen käytettävää aikaa. Vesijohtovedellä sinistämisen etuna on halvan hinnan ja helpon saatavuuden lisäksi se, että vesi huuhtoo ylimääräisen alumiinin pois preparaateista. Tämän seurauksena värit kestävät säilytystä paremmin ja värjäystulos on terävämpi. Huuhtelu juoksevilla vedellä on kuitenkin melko kovakourainen toimenpide, joka saattaa irrottaa soluja laseilta. Muiden sinistävien liuosten käyttöä kannattaa harkita, jos solujen pysyminen lasilla aiheuttaa ongelmia. (Bales 2006: 1593–1598; Milkin 2005.)

Sinistysliuoksena voidaan käyttää esimerkiksi Scott´s Tap Water- nimistä sinistysliuosta. Se valmistetaan esimerkiksi liuottamalla yhteen litraan vettä kaksi grammaa natriumbikarbonaattia ja 20 grammaa magnesiumsulfaattia. Näin saadaan aikaan emäksinen liuos, jonka pH on yli kahdeksan. Kastamalla lasit Scott´s Tap Water-liuokseen sinistys tapahtuu noin minuutissa. Sinistyksen lisäksi, Scott´s Tap Water terävöittää ja kirkastaa näytettä. Laseja ei tarvitse välttämättä differentoida, jos käytetään Scott´s Tap Water-sinistysliuosta. (Bales 2006: 1593–1598; Milkin 2005.)

Monissa laboratorioissa käytetään sinistäjänä ammoniakki-alkoholia. Liuos valmistetaan esimerkiksi lisäämällä 15 millilitraa 28–30-prosenttista ammoniakivettä 985 millilitraan 70-prosenttista etanolia. Ammoniakki tekee liuoksesta emäksisen, joten liuosta voidaan käyttää sinistämiseen. Ammoniakkia käsiteltäessä täytyy muistaa, että se on syövyttävää ja ympäristölle vaarallista. (Aho 2000: 144; Bales 2006: 1596; VWR 2004.)

#### 4.2.6 Sytoplasmavärit

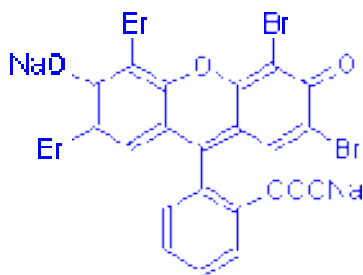
Orange-G-6-fosfovolframihappo (OG-6) on monokromaattinen, keltaisen-oranssi ja hapan väriaine. Se värjää keratiinin kirkkaan oranssiksi ja eosinofiilien granulat sekä pintakerroksen levyepiteelisolut asidofiilisesti. Orange G on erittäin pienimolekyylinen väriaine, ja juuri pienen kokonsa ansiosta se pääsee keratinisoituneiden solujen sisälle, minne muut suurempimolekyyliset väriaineet eivät pääse. Tämän värin ansiosta esimerkiksi levyepiteelisyövän patologinen keratinisaatio tulee esiin. (Bibbo 1991: 890; Aho 2000: 145; Horobin: 26–27.)



OG-6 sisältää Orange G-väriainetta ja fosfowolframihappoa. Liuos on tehty 95-prosenttiseen etanoliin. Fosfowolframihappo toimii peitta-aineena. Se sitoutuu vahvasti proteiineihin ja tekee väristä intensiivisemmän. Samaan tulokseen päästään, jos väriin lisätään jääetikkaa, jolloin positiiviset vetyionit reagoivat aminohappojen kanssa ja negatiivisesti varautunut OG-6 tarttuu paremmin valkuaisaineisiin. Orange G:llä värjätessä värjäysaika ei saa ylittää. Liian pitkä värjäysaika haittaa värjäyksen seuraavan sytoplasmanvärin eli Eosin Azuren sisältämän eosin Y:n toimivuutta. (Bibbo 1991: 890; Aho 2000: 145; Horobin: 26–27.)

Eosin Azur eli EA on polykromaattinen kahden tai kolmen värin muodostama kokonaisuus. Se sisältää light green-, eosin yellowish- (eosiini) ja joskus Bismarck brown- väriaineita. Lisäksi siinä on fosfowolframihappoa peitta-aineena. Emäksinen Bismarck brown kuului alkuperäiseen koostumukseen, mutta sen käyttöä ei pidetä enää tarpeellisenä, joten se puuttuu useimmista uusista liuosresepteistä. (Aho 2000: 145; Bibbo 1991: 890; Mattila 1997: 3.)

EA-väriliuos on tehty 95-prosenttiseen etanoliin. Light green on hapan väri. Se värjää aineenvaihdunnallisesti aktiivisten solujen, keskikerrossolujen, parabasaalisolujen ja lieriöepiteelisolujen sytoplasmat vihertäviksi. Histiosyytit, leukosyytit, pieni- ja suurisoluiset erilaistumattomat syöpäsolut sekä solut, jotka ovat peräisin adenokarsinoomasta värjäytyvät myös vihertäviksi. Eosiini (ks. kuvio 5) on hapan väri. Se värjää punaiseksi levyepiteelin pintasolut, punasolut ja värekarvat. Kaikki komponentit, jotka värjätään OG-6:lla keltaisiksi, voidaan värjätä eosiinilla oranssiksi. Kun eosiini ja OG-6 vaikuttavat yhtä aikaa, tulee lopputulokseksi oranssin ja keltaisen eri sävyjä. EA-väriliuokseen voi myös lisätä fast green-nimistä väriä, joka saa sytoplasmat värjäytymään vihertäviksi. (Aho 2000: 145; Bibbo 1991: 890; Mattila 1997: 3.)



KUVIO 5. Eosiinin kemiallinen rakenne. (Mukaanlillen Lillie 2005)

EA:sta on olemassa kolme erilaista versiota: EA 36, EA 50 ja EA 65. EA 36 oli alun perin kehitetty gynekologisten irtosolunäytteiden värjäämiseen, mutta sitä voi käyttää

myös muiden solujen värjäämiseen. EA 65 on kehitetty paksujen solunäytteiden värjäämiseen EA 36:n pohjalta. EA 50 on kaupallisesti valmistettava liuos. Se pyrkii vastaamaan alkuperäistä EA 36:ta, mutta sen koostumus vaihtelee suuresti valmistajasta toiseen. Lisäksi on vielä olemassa modifioitu EA. Se sisältää fast green- väriä, joka liukenee heikommin alkoholiin, eikä sen takia huuhtoudu soluista niin herkästi ulos. (Aho 2000: 145; Bibbo 1991: 890.)

#### 4.2.7 Alkoholisarjat

Papanicolaou-värjäyksessä näytelasit kuljetetaan alkoholia sisältävien maljojen kautta väriliuoksesta toiseen. Alkoholihuuhteluiden tarkoituksena on huuhdella ylimääräistä väriä pois ja helpottaa solujen siirtymistä liuoksesta toiseen. Solut säilyttävät paremmin muotonsa, kun niitä ei altisteta suurille muutoksille eli esimerkiksi kasteta ensin maljaan, jossa on 96-prosenttista alkoholia ja sitten maljaan, jossa on vesipohjaista väriainetta. Alkoholisarja muodostuu yleensä kolmesta maljasta, joiden alkoholipitoisuus laskee tai nousee. Yleisesti käytetään 50-, 70-, ja 96-prosenttisiä liuoksia. (Bibbo 1991:884; Horobin ym. 1998:152.)

Värjäyksen ensimmäinen alkoholisarja on laskeva, ja se loppuu tumaväriin eli vesipohjaiseen hematoksyliiniin. Laskevalla alkoholisarjalla saadaan aikaan solujen rehydraatio eli niihin tuodaan vettä, jolloin solut kestävät vesipohjaisella tumavärillä värjäämisen. Ensimmäisen laskevan alkoholisarjan tehtävänä on myös poistaa preparaattien valmistusvaiheessa käytetty PEG-fiksatiivi, joka heikentää värimolekyylien sitoutumista soluihin. (Bibbo 1991:884; Horobin ym. 1998:152.)

Myös väriliuosten jälkeiset huuhtelut on tehtävä samalla aineella, johon väri on liuotettu, joten ylimääräinen tumaväri huuhdellaan pois juoksevalla vedellä. Ennen sytoplasmavärejä näytteet viedään nousevan alkoholisarjan läpi, jonka tehtävänä on poistaa vesi eli dehydroida näytteet, sillä sytoplasmavärit ovat alkoholipohjaisia. Sytoplasmavärien välillä on alkoholihuuhtelut, jotka huuhtovat ylimääräisen edellisen värin pois ja valmistavat solut vastaanottamaan seuraavan sytoplasmavärin. Lopuksi lasit kuljetetaan 96-prosenttisen etanolin ja absoluuttisen etanolin kautta ksyleeniin, jolloin vesi saadaan kokonaan poistettua näytteistä. (Bancroft ym. 1994: 24; Bales 2006: 1593–1596.)

#### 4.2.8 Preparaattien peittäminen

Värjätyt lasit eivät saa päästä kuivumaan, minkä vuoksi ne peitetään suoraan värjäyksen viimeisestä ksyleenimaljasta. Ksyleenimalja otetaan koneesta pois ja viedään vetokaappiin, jossa lasien peittäminen tapahtuu. Lasit peitetään vetokaapissa, koska optinen väliaine on myrkyllistä hengittää. Optista väliainetta pipetoidaan näytelasille, jolloin on varottava koskettamasta näytelasia pipetin kärjellä kontaminaation välttämiseksi. Näytelasin ja väliaineen päälle laitetaan peitinlasi. (Bibbo 1991: 891–892; Bales 2006: 1603.)

Nykyään on olemassa myös peitinlasiautomaatteja, jotka peittävät lasit. Peitinlasiautomaatti on yleensä värjäysautomaatin yhteydessä, jolloin lasien peittäminen tapahtuu sujuvasti. Laite nostaa lasin kelkasta, laittaa sen päälle optista väliainetta ja painaa peitinlasin objektilasin päälle. Optinen väliaine muodostaa pysyvän siteen lasin ja peitinlasin välille. Se suojelee näytettä mekaaniselta kulutukselta, ilman kuivattavalta vaikutukselta ja värien haalistumiselta. (Bibbo 1991: 891–892; Bales 2006: 1603.)

Peitinlasin alle voi jäädä pieniä ilmakuplia. Ne näyttävät harmittomilta makroskooppisesti tarkasteltaessa, mutta mikroskoopissa ne haittaavat suuresti näkyvyyttä, joten ilmakuplat täytyy poistaa peittämisvaiheessa. Näytelasin, solumateriaalin, peitinlasin ja optisen väliaineen taitekertoimien täytyy olla mahdollisimman lähellä toisiaan, jotta näytettä voidaan mikroskopoida kunnolla. Optisia väliaineita on useita erilaisia, koska myös laseja on erikokoisia ja paksuisia. PH on kuitenkin kaikissa optisissa väliaineissa pyritty saamaan mahdollisimman lähelle neutraalia, jotta väliaine ei haalistaisi värejä. (Bibbo 1991: 892; Bales 2006: 1603.)

#### 4.3 Liuosten säilytys ja huolto

Papanicolaou-värjäyksessä käytettävien liuosten vaihtamisesta ja suodattamisesta täytyy huolehtia ennalta laaditun aikataulun mukaisesti. EA:n sisältämä light green-väri on liuoksista valoherkin, mutta kaikki liuokset ovat yleisesti ottaen melko kestäviä. Kestävydestä huolimatta liuokset säilyvät parhaiten, jos ne säilytetään tummissa ja ilmatii- viissä pulloissa. Tällöin voidaan ehkäistä liuosten haihtuminen ja kosteuden saaminen ilmasta. Lisäksi värit ovat suojassa mikrobeilta. Värien käyttöikä pidentää myös, jos näytteitä värjättäessä näytekelman annetaan olla hetken aikaa imupaperin päällä ennen

seuraavaan maljaan siirtämistä. Tämä vähentää värien siirtymistä maljasta toiseen. Kelkan noustessa maljasta, esimerkiksi Medite TST 40-värjäysautomaatissa, kelkan alle siirtyy metallinen levy, jossa on imupaperia. (Aho 2000: 145; Bales 2006: 1598, Takahashi 1971: 53.)

Liuosten vaihtotiheys riippuu päivittäin värjättävästä näytemäärästä. Sopivan vaihtotiheyden löytämiseksi suositellaan päivittäistä lasien laadun tarkistamista mikroskopimalla. Yleisesti ottaen hematoksyliini säilyttää melko hyvin värjäyskykynsä. Mikäli väriä lisätään maljaan päivittäin korvaamaan haihtunut ja lasien mukana kadonnut väri, hematoksyliinia ei tarvitse välttämättä koskaan korvata kokonaan uudella. Orange G ja EA menettävät värjäyskykynsä sen sijaan nopeammin kuin hematoksyliini ja ne pitäisi korvata kokonaan uudella värillä kerran viikossa tai heti kun solut näyttävät harmailta, sameilta tai kontrasti huononee. Värit täytyy aina suodattaa vaihdon tai lisäyksen yhteydessä solukontaminaation välttämiseksi. (Bales 2006: 1589–1599.)

Sinistysliuos ja HCl-differentaatio-liuos pitäisi korvata vähintään kerran päivässä. Alkoholi-liuokset, jotka edeltävät sytoplasmavärejä, pitäisi tarkistaa ajoittain hydrometrillä eli mittarilla, jolla voidaan määrittää esimerkiksi nesteen alkoholipitoisuus. Alkoholiliuokset tulisi vaihtaa kerran viikossa tai päivittäin, jolloin sytoplasmavärien suodatuksen tarve vähenee. Sytoplasmavärien jälkeen tulevat alkoholihuuhtelut vaihdetaan yleensä rotaatiomallin mukaisesti; välittömästi värin jälkeen tuleva likaisin alkoholi kaadetaan pois ja maljoja siirretään yksi askel taaksepäin niin, että uusin ja puhtain alkoholimalja tulee viimeiseksi ketjuun. Tämä toistetaan jokaisen värjäyksen jälkeen. Absoluuttiset alkoholit pitäisi vaihtaa vähintään kerran viikossa. Ksyleeni suodatetaan kerran päivässä tai vaihdetaan heti kun siinä ilmenee sytoplasmaväriä. Ksyleenin seassa oleva vesi saa ksyleenin näyttämään maitomaiselta ja vaikuttaa värjäystulokseen huonontamalla sitä. Jos veden joutuminen ksyleeniin aiheuttaa ongelmia, ksyleeniin voi lisätä Silica-Gel tabletteja, jotka absorboivat vettä. (Bibbo 1991: 891; Bales 2006: 1589–1599.)

#### 4.4 Muita värjäyksen laatuun vaikuttavia tekijöitä

Papanicolaou-värjäys vaatii onnistuakseen myös, että värjäyksessä käytettävien liuosten pH-arvot ovat kohdillaan. Erityisesti sytoplasmaväri EA:n pH:n kontrollointi kannattaa

paremman ja kestävämmän värjäystuloksen saavuttamiseksi. Sen pH:n pitäisi olla välillä 4.5–5, jotta saavutetaan paras värjäystulos. Mikäli EA alkaa muuttua emäksiseksi, happamuutta voi lisätä sekoittamalla 100 millilitraan väriainetta 2 millilitraa jääetikkaa. Orange G:n pH:n tulisi olla yhden luokkaa, jotta väri toimii optimaalisesti. PH:n noustessa kolmeen, värin intensiteetti puolittuu. Jos vesijohtovettä käytetään sinistykseen, sen pH saattaa olla liian hapan, jolloin vesi ei saa aikaan riittävän suurta sinistävästä vaikutusta. Veden pH voi myös vaihdella vuodenajan mukaan. Veden pH:n tulisi olla yli 8, jotta sinistäminen onnistuu. (Bibbo 1991: 891; Bales 2006: 1599–1600.)

Näytepreparaatteja ei kannata jättää seisomaan sytoplasmavärien jäljessä tuleviin alkoholeihin yhtään pidemmäksi aikaa kuin on tarpeellista hyvän värjäystuloksen aikaan saamiseksi. Väriaineet, jotka ovat päässeet soluun sisälle, huuhtoutuvat ulos, jos preparaattien annetaan seistä liian pitkään korkeassa alkoholikonsentraatiossa. Erityisesti eosiinia sisältävän EA:n jälkeisellä huuhtelulla on paljon merkitystä paremman asidofiilisen värisävyn aikaan saamiseksi. Eosiini liukenee veteen ja jonkin verran alkoholiin eli liian pitkiä huuhteluaikoja tulee varoa, jotta vältettäisiin ylimääräisen värin poistuminen solujen sytoplasmoista. (Bibbo 1991: 891)

Agitaatio eli näytelasien heilutus maljassa värjäyksen aikana on tärkeää. Agitaation määritelmänä käytetään lasien upottamista kokonaan maljaan ja nostamista sitten kokonaan ylös. Tätä tulee tehdä jatkuvalla ja säännöllisellä liikkeellä. Kasto kestää yleensä noin sekunnin. Agitaatio tehostaa lasien huuhtelua ja parantaa värjäystuloksen terävyyttä. Lasien heiluttaminen edes takaisin maljassa pitää tehdä varovasti ja näytekelkka ei saa osua maljan pohjaan, sillä liian kovakourainen käsittely saattaa irrottaa soluja laseilta. Liuoksen täydellinen poistuminen soluista saattaa vaatia jopa kymmenen kastokertaa. Kastokertojen määrässä on huomioitava, kuinka paljon väriliuosta halutaan poistaa näytteistä. (Bibbo 1991: 891; Bales 2006: 1599)

#### 4.5 Kontaminaation välttäminen

Hematoksyliini, EA ja OG-6 pitäisi suodattaa vähintään kerran päivässä, erityisesti sen jälkeen, kun on värjätty syöpäsoluja sisältävä näyte. Hyvälaatuinen, keskinopea suodatinpaperi poistaa suurimman osan soluista. Alkoholit ja ksyleenit täytyy myös suodattaa tai vaihtaa päivittäin. Gynekologiset ja ei-gynekologiset näytteet pitäisi värjätä eri mal-

joja käyttäen, mutta muut ei-gynekologista materiaalia sisältävät näytteet voi värjätä yhdessä. Ristikontaminaation välttämiseksi suositellaan kuitenkin, että näytteet, joista irtoaa herkästi soluja, värjättäisiin eri maljoja käyttäen tai eri värjäyskerralla. (Bales 2006: 1600; Takahashi 1971: 53.)

Tavallisesta näytteestä irronneet solut tunnistaa solukontaminaatioksi siitä, että nämä solut ovat eri tasossa muuhun solumassaan nähden tai kertyvät preparaatin reunoille. Runsaasti syöpäsoluja sisältävistä effuusionäytteistä irtoaa usein maligneja soluja, jotka saattavat tarttua johonkin toiseen näytteeseen. Siksi niitä ei ole suositeltavaa värjätä muiden näytteiden kanssa, vaan ne pitäisi seuloa pois näytejoukosta. Seulonta voidaan tehdä värjäämällä epäilyttävän näytteen sedimenttitippa toluidiinisinillä. Näin näyte voidaan alustavasti mikroskopoida ja kaikkein ilmeisimmät syöpäeffuusionäytteet saadaan karsittua ja värjättyä erikseen. Syöpäeffuusionäytteen värjäyksen jälkeen värit tulee suodattaa tai vaihtaa. (Bales 2006: 1600; Takahashi 1971: 53.)

Vaikka värjäys suoritettaisiin huolellisesti, ristikontaminaatiota voi tapahtua ja erityisesti malignien solujen aiheuttama kontaminaatio on erittäin haitallista. Mikäli kontaminaatiota epäillään, täytyy kaikki liuokset välittömästi suodattaa tai vaihtaa. Lasien peittämisessä käytettävä optinen väliaine kannattaa myös tarkistaa mikroskopoimalla, sillä sekin saattaa olla kontaminaation lähde. (Bales 2006: 1600.)

#### 4.6 Uusia versioita Papanicolaou-värjäyksestä

Perinteisen Papanicolaou-värjäyksen pohjalta on kehitetty joitakin uusia versioita ulkomailla, mutta saamiemme tietojen mukaan niitä ei käytetä vielä Suomessa. Vuonna 1995 kehitettiin uusi ympäristöystävällisempi ja edullisempi värjäysmenetelmä. Lähtökohtana oli vähentää ksyleenin ja alkoholin käyttöä, joita Papanicolaou-värjäys kuluttaa runsaasti. Ksyleenin sekä alkoholin runsas käyttö kuormittaa ympäristöä ja nämä reagenssit ovat myös suhteellisen kalliita. Myös sinistysliuokset on korvattu huomattavasti edullisemmalla vaihtoehdolla eli vesijohtovedellä. (Gill 2006: 105.)

Sytoplasmaväri OG-6:ta edeltävät alkoholihuuhtelut on korvattu pelkällä vesijohtovedellä. Historiallisesti näiden alkoholien tehtävänä on ollut solujen dehydroiminen OG-6:n valmistuksessa käytetyn alkoholin konsentraation tasolle. Myöhemmin on ajateltu,

että näin on myös vältetty OG-6:n laimentuminen ja värjäystehon heikentyminen. Nämä oletukset on kuitenkin osoitettu muutamissa tutkimuksissa kokeellisesti vääriksi. Sytoplasmaväri OG-6:n ja EA:n jälkeiset alkoholihuuhtelut on korvattu 0,5-prosenttisella etikkahapolla, jonka hapan pH pitää happamat värit soluissa tuottamalla saman efektin kuin 95-prosenttinen etanoli. 0,5-prosenttisella etikkahapolla ei ole happamuudesta huolimatta differentaatio-vaikutusta kuten HCl:llä, koska sen pH on liian heikko. Uudessa menetelmässä etanolia käytetään vasta aivan värjäyksen lopussa EA:n jälkeisten etikkahappo-huuhteluiden jälkeen ennen ksyleeniä. (Gill 2006: 105–106.)

Menetelmässä ei käytetä sinistysliuosta kuten Scott's Tap Water-liuosta, koska joidenkin kokeilujen mukaan sinistäminen onnistuu tyydyttävästi pelkällä vesijohtovedellä: sinistämisen pitäisi olla mahdollista vesijohtoveden pH:n ollessa vain yli 5 ja sinistys ajaksi riittäisi tällöin 2 minuuttia. Ksyleenin käyttöä on vähennetty pidentämällä sen käyttöikää lisäämällä ksyleeniin Silica-Gel pellettejä. Käyttöikää voidaan pidentää myös suodattamalla ksyleeniä värjäyksien välissä. Alkoholimalja ennen ksyleeniä kannattaa pitää puhtaana, jotta vältetään ksyleenin kontaminoituminen väreillä. (Gill 2006: 105; 107.)

Värjäystulosten pitäisi olla yhtä hyviä kuin perinteisessä Papanicolaou-värjäyksessä. Kromatiini värjäytyy siniseksi, keratinisoituneet solut ja eosinofiilien granulat keltaisesta oranssiin, pintalevyepiteelisolut, erytrosyytit, nukleolit ja värekarvat oranssinpinkistä punaiseen ja muiden solujen sytoplasmat värjäytyvät vihertäviksi. Värjäyksen ongelmaksi on havaittu näytteiden ylivärjäytyminen OG-6:lla, jolloin solujen värjäytyminen punaiseksi ei onnistu, koska sytoplasmoissa oleva liiallinen OG-6 estää EA:ta värjäämästä sytoplasmoja. Ongelma voidaan välttää rajoittamalla värjäysaikaa ja viemällä näytteet OG-6:sta nopeasti 0,5-prosenttiseen etikkahappomaljaan. (Gill 2006: 107.)

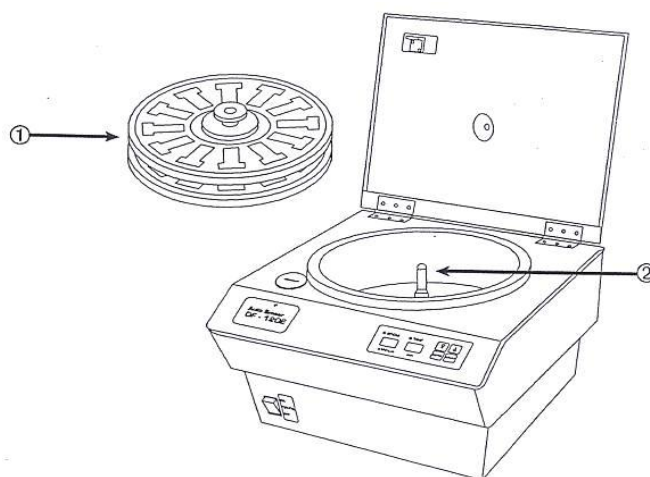
Papanicolaou-värjäyksestä on myös kehitetty perinteistä värjäystä nopeampi versio, joka kestää vain 90 sekuntia. Värjäys on nimeltään Ultra Fast-Papanicolaou-värjäys ja sen kehittivät Yang, Alvarez ja Young vuonna 1995 ohutneulabiopsianäytteitä varten. Värjäys tekee preparaateista läpinäkyviä ja värjää ne polykromaattisesti tuman yksityiskohtien näkyessä terävänä kirkaalla taustalla. Ultrafast-Papanicolaou-värjäyksessä sytoplasmiset yksityiskohdat näkyvät erinomaisesti erityisesti maligneissa lymfoomissa ja kilpirauhaskasvaimissa. (Bales 2006: 1601.)

Värjäyksen nopeus perustuu nopeaan rehydraatioon tavallisessa fysiologisessa suolaliuoksessa ja Richard-Allanin hematoksyliiniin, joka värjää näytteen kahdella hitaalla kastolla. Sytoplasma värjätään Richard-Allanin sytoplasmavärillä, joka sekin värjää jo neljässä hitaassa kastossa. Värjäyksen muut vaiheet ovat myös hyvin nopeita. Värjäyksen lopussa oleva nouseva alkoholisarja koostuu 95-prosenttisesta ja 100-prosenttisestä etanolista, joissa laseja kastetaan kuusikertaa. (Bales 2006: 1601.)

## 5 LAITTEIDEN TOIMINTA- JA KÄYTTÖPERIAATTEET

### 5.1 Sakura Autosmear TM Sytosentrifugi

Sytosentrifugeja valmistavat useat eri valmistajat. Yksi heistä on Sakura, joka valmistaa Autosmear TM merkistä sytosentrifugia (ks. kuvio 6). Sytosentrifugin tehtävänä on siirtää sytologisessa näytteessä tai fiksatiivissa olevat solut 75mm x 25mm kokoiselle aluslasille. Solujen siirtyminen tapahtuu sentrifugin keskipakoisvoiman avulla. Sytosentrifugitekniikan avulla saadaan mahdollisimman suuri solumäärä talteen myös näytteistä, joissa näyte- tai solumäärä on erittäin niukka. Sentrifugoinnin kiertonopeus voidaan ohjelmoida välille 500 - 2500 kierrosta minuutissa ja sentrifugointiaika 60 minuuttiin asti tarpeiden mukaan. (Algol Pharma Diagnostiikka: 2; Whitaker-Williams 1994: 10.1–14.)



KUVIO 6. Sytosentrifugin rakenne: Roottori(1) ja Roottorikammio(2). (Mukaiillen Sakura työohje.)

Sentrifugin sisällä on roottori, johon asetetaan näytekyyvetit. Laitteen värinän ja vaurioitumisen estämiseksi näytteitä on asetettava parillinen määrä, ja ne on sijoitettava pareittain roottorin akselin vastakkaisille puolille. Jos käsiteltäviä näytteitä on pariton määrä,

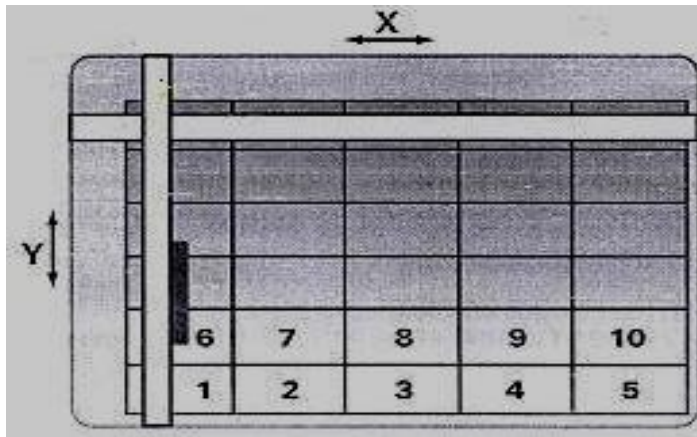


laitteen tasapainottamiseksi on käytettävä vedellä täytettyä kyvetiä. Ennen sentrifugin käynnistämistä on tarkistettava, että roottori pääsee pyörimään vapaasti ja akryylikansi tulee sulkea. Laitteen etuosassa on etupaneeli, jonka avulla tapahtuu laitteen ohjaus ja valvonta. Sentrifugissa voidaan käsitellä kerrallaan 12 näytettä. (Algol Pharma Diagnostiikka: 2; 15–17; Sakura Finetek Europe B.V. 2005.)

## 5.2 Medite TST 40 - Värjäysautomaatti

Medite TST 40 - värjäysautomaatti on toimintaperiaatteeltaan lineaarinen X-Y -värjäysautomaatti. Laite sopii suurten näytemäärien värjäämiseen ja sitä käytetään histologiassa sekä sytologiassa pääasiassa rutiinivärjäyksien suorittamiseen. Laitteeseen mahtuu 12 näytekalkkaa ja yhteen kalkkaan voidaan asettaa jopa 20 tai 30 näytelasia. Värjäysautomaatissa on liuosaltaille 41 paikkaa eli asemaa, joista neljä on aloitus-, neljä lopetus- ja viisi juoksevalle vedelle tarkoitettua asemaa. Loput 28 asemaa ovat värjäysliuoksia varten. Jokaiselle asemalle voidaan valita 99 nimen liuoslistasta nimi altaan sisältämän liuoksen mukaan. Yhden altaan tilavuus on 360 millilitraa. Automaatin tiedostoon mahtuu 20 värjäysohjelmaa, joista jokaisessa on 40 askeleen muisti. (Sairtec Oy: 50; Vibratome: TST Stainer Trio.)

Värjäysautomaatin lineaarisuus tarkoittaa, että automaatti liikuttaa kelkankuljettimella näytekalkkaa liuosaltaasta toiseen. Linearisissa värjäysautomaateissa on siis kantomekanismi, johon näytekalkat asetetaan. Kelkankuljetin kuljettaa kelkkoja altaasta toiseen, ja liuosaltat pysyvät paikoillaan värjäysprosessin ajan. Rotaatiomallisessa värjäysautomaatissa liuosaltat sen sijaan pyörivät ympäri ja asettuvat vuorotellen näytekalkkanpidikkeen alle, jonka tehtävänä on vain laskea kelkka altaaseen. Lineaarinen malli mahdollistaa useampien erilaisten värjäysohjelmien ohjelmoinnin kuin rotaatiomalli. Värjäysautomaatin X-Y -ominaisuus tarkoittaa, että automaatti pystyy liikuttamaan näytekalkkoja X-Y -koordinaattien mukaisesti (ks. kuvio 7). Tätä tekniikkaa käyttävät värjäysautomaatit pystyvät suorittamaan monenlaisia värjäysohjelmia. Värjäysautomaattiin voidaan ohjelmoida myös agitaatio -ominaisuus eli samalla, kun kelkka on altaassa, sitä heilutellaan ylös ja alas. Lineaarinen X-Y- värjäysautomaatti sopii ominaisuuksiltaan hyvin hematoksyliini-eosiinivärjäykseen. (Earle 2000: 30–32 )



KUVIO 7. Värjäysautomaatti liikuttaa näytteitä maljasta toiseen X-Y-koordinaattien mukaisesti. (Mukaiillen Earle 2000:33)

Värjäysohjelma luodaan valitsemalla sopivat liuokset, altaiden järjestys ja värjäysaika. Ohjelmat voidaan suunnitella, ja niitä voidaan muuttaa omien tarpeiden mukaan. Värjäysohjelmia suunniteltaessa on otettava huomioon värjättävä näytemateriaali, koska sillä on merkittävä vaikutus värjäyksen lopputulokseen. Erilaiset näytetyypit vaativat erilaisia värjäysaikoja kussakin liuoksessa. Hyvän värjäystuloksen saavuttaminen vaatii oikeanlaisten aikojen ohjelmointia. (Earle 2000: 34–36; Sairtec Oy: 18.)

## 6 TUTKIMUSONGELMAT

Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa värjätään tällä hetkellä sytosentrifuugivalmisteita käsivärjäysmenetelmällä, jolla on saatu aikaan hyviä tuloksia, mutta värjäyksen automatisointi nopeuttaisi laboratoriotyön prosessia. Hyvällä automatisoidulla värjäyksellä saataisiin myös tasaisempia värjäystuloksia. (Earle 2000: 30.) Automaattista värjäysohjelmaa on jo aikaisemmin yritetty ottaa käyttöön, mutta käyttökelpoista ohjelmaa ei ole onnistuttu vielä kehittämään. Laboratoriosta löytyy Medite TST 40- värjäysautomaatti, jota käytetään tällä hetkellä vain gynekologisten irtosolunäytteiden Papanicolaou-värjäykseen ja sytosentrifuugivalmisteiden värjäys haluttaisiin siirtää samalle koneelle.

Sytosentrifuugivalmisteita ei voida värjätä samalla värjäysohjelmalla kuin gynekologisia irtosolunäytteitä näytteiden erilaisten ominaisuuksien vuoksi, vaan niille täytyy kehittää oma värjäysohjelma. Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa on tehty jo erilaisia kokeiluja optimaalisen värjäystuloksen löytämiseksi. Hyvä värjäytyvyys saatiin käyttämällä sinistämiseen 3-prosentista ammoniakialkoholiliuosta, jota käytetään myös hyvin toimivassa käsivärjäysmenetelmässä. Ammoniakkialkoholiliuos muodosti kuitenkin emäksisiä höyryjä koneen sisälle, mikä taas vaikutti muiden liuosten pH-

arvoihin. Tämän seurauksena gynekologisten irtosolunäytteiden sytoplasmojen värjäytyvyys heikkeni, joten ammoniakkialkoholisistäjän käyttö jouduttiin lopettamaan.

Sopiva värjäysohjelma tulisi kehittää ilman ammoniakkialkoholia, koska sekä gynekologiset irtosolunäytteet että sytosentrifugivalmisteet pitää pystyä värjäämään samalla koneella. Värjäyksen tulokseen on yritetty vaikuttaa myös muuntelemalla värjäysaikoja ja vaihtamalla tumaväriä, mutta optimaaliseen värjäystulokseen ei ole päästy, koska laboratorion henkilökunnalla ei ole ollut aikaa tehdä tarpeeksi kokeiluja. Tämän takia he tarvitsevat ulkopuolista apua sopivan värjäysohjelman löytämiseen.

Tutkimuksemme pääongelma on: Millaisella värjäysohjelmalla saadaan aikaan optimaalinen värjäystulos Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa? Olemme selvittäneet kirjallisuuden avulla, miten eri tekijät vaikuttavat värjäyksen laatuun. Papanicolaou-värjäyksessä erilaisia tekijöitä, joihin voimme vaikuttaa laadun parantamiseksi, ovat tumavärin ja sytoplasmanvärien ajat, differentaatioliuoksen käyttö, alkoholisarjojen käyttö, vesihuuhteluiden ajat ja sinistysliuoksen käyttö. Tarkastelemme pääongelmaa näiden tekijöiden kautta.

## 7 TUTKIMUKSEN ETENEMINEN

### 7.1 Näyttemateriaalin valinta

Laboratorion henkilökunta oli kerännyt talteen näytteitä tutkimusta edeltävinä viikkoina. Meille oli säästetty pääasiassa runsaasti soluja sisältäviä näytteitä, jotta saisimme yhdestä näytteestä riittämään soluja mahdollisimman moneen preparaattiin. Tarkoituksena oli käyttää samaa näyttemateriaalia jokaisen värjäyksen preparaattien valmistamiseen, koska silloin värjäyksien vertailu toisiinsa on helpompaa ja luotettavampaa. Jos näyttemateriaalit olisivat joka värjäyksessä erilaisia, olisi vaikeaa päätellä, ovatko värjäyksen laadun muutokset seurausta värjäysohjelman muuttumisesta vai näyttemateriaalin vaihtumisesta.

Valitsimme näytteet yhdessä patologi Marketta Riihelän ja esitarkastaja Pirjo Nuorluodon kanssa. Lopullisen arvioinnin sopivasta värjäyksestä tekevät patologit ja esitar-

kastajat, joten oli tärkeää, että he saavat itse valita tutkimukseen näyttemateriaalin, jonka avulla heidän on mahdollisimman helppoa arvioida värjäyksen toimivuutta. Aikaisemmissa värjäyskokeiluissa yksi ongelmista oli ollut sytoplasmavärien esille saaminen. Esimerkiksi makrofagien sytoplasmat olivat värjäytyneet huonosti, joten valitsimme mukaan myös runsaasti makrofageja sisältävän näytteen.

Riihelä ja Nuorluoto valitsivat tutkimukseen mukaan kymmenen erilaista näytettä. Näytteistä kaksi oli virtsanäytteitä: toinen oli papa-luokaltaan kaksi ja toinen neljä. Näytteistä kolme oli ohutneulabiopsioita, joiden papa-luokka oli kolme. Näytteet oli otettu eri kohteista: imusolmukkeesta, maksasta ja kilpirauhasesta. Otimme mukaan myös kaksi bronkuseritenäytettä, joiden papa-luokka oli yksi. Molemmat oli otettu imutekniikalla, mutta näytteiden sisältämä materiaali poikkesi toisistaan. Toisessa näytteessä oli runsaasti makrofageja ja toisessa paljon epiteelisolukkoa sekä limaa. Saimme runsaasti värjäyksen arvioinnin kannalta hyviä pleuranestenäytteitä, joten näitä otettiin tutkimukseen mukaan kolme. Yksi näytteistä oli papa-luokaltaan viisi ja erittäin verinen. Kaksi muuta näytettä olivat papa-luokiltaan kolme, mutta toisessa oli paljon eosinofiilejä ja toisessa paljon verta. (Ks. taulukko 4.)

TAULUKKO 4. Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden ominaisuudet.

Näytelaatu	Näytenumero	Papa-luokka	Muuta tietoa	Näytemäärä µl per lasi
Virtsa	101	2	Uroteelisoluja, levyepiteeliä	300
	102	4	Verinen	150
	104	5	Uroteelisoluja, levyepiteeliä	250
Ohutneulabiopsia	201	3	Imusolmuke	300
	202	3	Maksa	300
	203	3	Kilpirauhanen	300
Pleuraneste	301	2	Verinen	300
	302	2	Paljon eosinofiilejä	100
	303	5	Verinen	50
Bronkuserite	401	1	Imunäyte, makrofageja	300
	402	1	Imunäyte, epiteeliä, limaa	300

Numeroimme näytteet juoksevilla numeroilla, jotta potilaiden anonymiteetti säilyisi. Päätimme numeroida virtsanäytteet alkaen numerosta 101, ohutneulabiopsianäytteet numerosta 201, pleuranäytteet numerosta 301 ja bronkuseritenäytteet numerosta 401. Käytimme työssämme näytteiden tunnisteina ainoastaan näitä numeroita. Aloitimme värjäyskokeilut värjäämällä kymmenen näytelasia ohjelmaa kohden. Seitsemän värjäysohjelman jälkeen huomasimme, että näytemäärää kannattaa vähentää, koska kymmenen näytteen arviointi kustakin värjäyksestä oli liian raskasta, ja värjäyksien arvioiminen näytti onnistuvan pienemmälläkin näytemäärällä. Jatkoimme siis H-värjäyksestä eteenpäin viidellä näytteellä, jotka olivat 101, 102, 302, 303 ja 402.

Saimme näytteet riittämään 12. erilaiseen värjäysohjelmaan. Virtsanäyte 101 loppui L-värjäykseen jälkeen, joten korvasimme sen solumäärältään ja papa-luokaltaan vastaavalla näytteellä, jonka merkitsimme numerolla 103. Myöhemmin paljastui, että näytteen solut olivat liian degeneroituneita, minkä takia värjäyksen onnistumisen arviointi ei ollut mahdollista. Korvasimme näytteen toisella virtsanäytteellä, jonka numeroksi annoimme 104. Näyte 104 oli papa-luokaltaan 5 ja erittäin runsassoluinen, toisin kuin 101. Valitsimme näytteen 104 silti mukaan tutkimukseen, koska siitä löytyi värjäyksen onnistumisen arvioinnin kannalta samoja tärkeitä soluja kuin näytteestä 101, kuten esimerkiksi uroteelisoluja ja levyepiteelisoluja. Teimme näytteelle 104 samat värjäykset, jotka olimme tehneet näytteelle 103 eli värjäsimme sen M-, N-, ja O-ohjelmilla.

## 7.2 Preparaattien valmistaminen

Tutkimuksen luotettavuuden lisäämiseksi pyrimme siis, että jokaisella värjäysohjelmalla värjätään samanlainen näytesarja. Tämä tarkoittaa käytännössä, että teimme yhdestä näytteestä aina niin monta preparaattia kuin kehitimme värjäysohjelmia. Jotta tämä olisi mahdollista, käytimme jokaisen preparaatin valmistamiseen mahdollisimman vähän näytettä. Pienen näytemäärän käyttö oli mahdollista, koska käytimme pienintä kyvettä, joka laboratoriosta löytyi. Kyvetin tilavuus oli 1 ml. Kyvetissä käytettävä rajaaja antoi mikroskopointi pinta-alaksi 7 mm<sup>2</sup> ja tarkistimme koevärjäyksen avulla, että ala on riittävä värjäyksen onnistumisen arviointiin.

Käytimme yhden lasin valmistamiseen, näytteen solumäärän mukaan, joko 300 µl:aa, 250 µl:aa, 150 µl:aa, 100 µl:aa tai 50 µl:aa näytettä. Runsassoluisten näytteiden kohdalla 50 µl:aa oli sopiva määrä riittävän solutiheyden takaamiseksi lasille, mutta hieman laimeampien näytteiden kohdalla tarvitsimme 300 µl:aa näytettä, jotta värjäystä voitiin arvioida. PEG-fiksatiivia lisäsimme kyvetteihin poikkeuksetta 50 µl:aa, minkä jälkeen täytimme kyvetin 1 ml:n merkkiviivaan asti 50-prosenttisellä etanolilla. Sentrifugoimme kaikkia näytteitä Sakura Autosmear TM- sytosentrifugilla viiden minuutin ajan nopeudella 2 000 kierrosta minuutissa (RPM). Sentrifugoinnin jälkeen irrotimme preparaattit kyveteistä ja annoimme preparaattien kuivua huoneenlämmössä noin tunnin ajan ennen värjäämistä. Värjäämisen jälkeen peitimme preparaattit aina käsin.

Käytimme preparaattien valmistamiseen gelatiinilaseja, koska niitä käytetään normaalisti Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa sytologisten preparaattien valmistamiseen. Solut pysyvät henkilökunnan kokemuksen mukaan paremmin gelatiinilaseilla kuin kaupallisilla laseilla. Henkilökunta valmistaa itse gelatiinilasit, koska niitä ei ole kaupallisesti tarjolla. Käytimme tutkimuksemme aikana paljon gelatiinilaseja, joten valmistimme niitä lisää helpottaaksemme henkilökunnan työmäärää.

### 7.3 Alkuperäinen värjäysohjelma ja sen kehittäminen

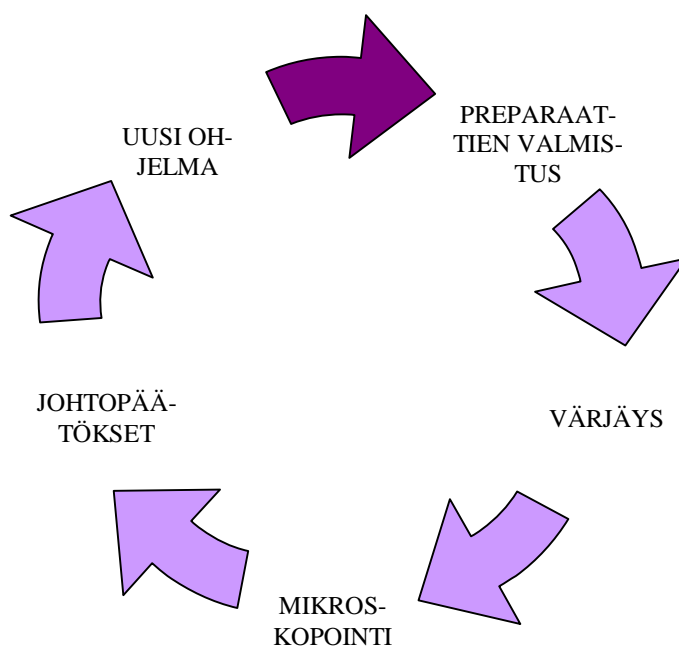
Tutkimuksen lähtökohtana oli värjäysohjelma, jota oli käytetty aikaisemmin Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa. Ohjelman oli laatinut laboratoriohoitaja Sue Hyypijev 5.10.2005 ja sen oli tarkastanut apulaisosastonhoitaja Kaija Halonen 3.9.2007. Ohjelma oli melko pelkistetty (ks. liite 1). Siinä ei käytetty ollenkaan differentaatio- eikä sinistysliuoksia. Tumaväriä käytettiin Gill:n hematoksylliiniä, jota päätimme laboratorion henkilökunnan toivomuksesta käyttää tumaväriä myös koko tutkimuksemme ajan. Laboratoriossa oli aikaisemmin kokeiltu myös Mayerin hematoksylliinin käyttöä, mutta sen avulla ei oltu saatu aikaan hyviä värjäystuloksia.

Nimesimme alkuperäisen ohjelman A-värjäysohjelmaksi ja värjäsimme lasit sillä, jotta näkisimme, millaisia värjäystuloksia tällä ohjelmalla saadaan aikaan, ja mihin suuntaan ohjelmaa kannattaa kehittää. Halusimme myös kokeilla, onko näytteiden paksuus sopiva ja pienen kyvetin antama mikroskopointipinta-ala riittävän suuri. Mikroskopoimme värjättyjä preparaatteja yhdessä Marketta Riihelän ja Pirjo Nuorluodon kanssa. Totesimme, että käytetty kyvetti ja raaja antoivat tarpeeksi suuren mikroskopointipinta-alan värjäyk-

sen onnistumisen arviointiin. Näytteiden paksuus oli myös hyvä, lukuun ottamatta kolme näytettä. Sovimme, että kahteen näistä laitetaan jatkossa 150 µl:aa näytettä ja yhteen vain 100 µl:aa. Värjäsimme näytteet uudelleen A-ohjelmalla, jotta kaikki preparaattit olisivat vertailukelpoisia.

A-värjäysohjelma värjäsi näytteet harmahtaviksi ja ”suttuisen” näköisiksi. Tumat olivat useimpien näytteiden kohdalla liian tummia, minkä seurauksena tumamorfologiaa oli vaikea hahmottaa. Näytteiden sytoplasmoista puuttui läpikuultavuus ja kauniin vihertävä sävy. Esimerkiksi makrofagiin kohdalla sytoplasmavärjäytyminen oli liian harmaata. Päätimme aloittaa toimivan värjäysohjelman kehittämisen muuttamalla A-värjäysohjelman muuttujia yksi kerrallaan. Tumaväriaika on yksi värjäyksen merkittävimmistä tekijöistä, joten kokeilimme sen muuttamista ensimmäisenä. Epäilimme tumaväriaajan olevan liian pitkä ohjelmassa A, koska liian pitkä tumaväriaika tekee tumista liian tummia ja peittää alleen sytoplasmavärit, jolloin sytoplasmoista tulee harmahtavia. (Bales 2006: 1599-1600.)

Tästä eteenpäin työskentelymme noudatti tiettyä kaavaa. Valmistimme preparaattit, värjäsimme ne uudella ohjelmalla ja mikroskoipoimme ne Riihelän ja Nuorluodon kanssa. Muutimme vanhan ohjelman eri muuttujia havaintojemme mukaan, jolloin syntyi uusi ohjelma. Valmistimme preparaattit ja värjäsimme ne uudella ohjelmalla (ks. kuvio 8) kunnes lopulta olimme kehittäneet 15 värjäysohjelmaa. Liitteessä 2 esitellään empirinen työvaihe yksityiskohtaisemmin.



KUVIO 8. Kuvion aloituskohta on purpuran värinen nuoli.

#### 7.4 Tumaväriajan muuttaminen

Alkuperäisessä eli A-värjäysohjelmassa tumaväriaika oli kaksi minuuttia. Seuraavaksi värjäsimme kaikki näytteet ohjelmalla B, johon valitsimme tumaväriajaksi minuutin. Riihelä arvioi värjäyksen onnistumisen, koska Nuorluoto ei ollut paikalla. Huomasimme, että laimennetuista näytteistä kaksi olivat paksuudeltaan sopivia, mutta näyte 303 oli edelleen liian paksu. Sovimme, että käytämme preparaatin valmistamisessa jatkossa ainoastaan 100 µl:aa näytettä.

Vertailimme B-värjäystä A-värjykseen. Värjäytyvyys vaihteli eri näytteiden kohdalla. Joidenkin kohdalla oli vaikea huomata merkittävää eroa A- ja B-värjäyksien välillä, mutta yleisesti ottaen B-ohjelmalla värjätyt näytteet olivat vaaleampia, siistimpiä ja helpompia katsoa. Tumat olivat vaaleampia, mikä toi varmuutta tumamorfologian erottamiseen ja sytoplasmat värjäytyivät myös vaaleammin sekä kauniimmin, mutta erittäin lymfosyyttipitoisen näytteen kohdalla tilanne oli päinvastainen. B-värjäyksessä lymfosyytit värjäytyivät epäselvästi. Ne näyttivät melkein degeneroituneilta ja tumat olivat epätarkkoja. A-värjäyksessä lymfosyytit värjäytyivät sen sijaan terävästi ja siististi.

Päätimme tehdä kompromissin tumaväriajan suhteen eli muuttaa ajan 1,5 minuuttiin C-ohjelmassa. Muutimme ainoastaan tumaväriaikaa eli säilytimme muut muuttujat samoina. Värjäys oli lähes samanlainen kuin aikaisemmat värjäykset. Tumat värjäntyivät hieman paremmin kuin aikaisemmin, joten päätimme käyttää jatkotutkimuksissa tumaväriaikana 1,5 minuuttia. Värjäyksen yleisilme oli edelleen liian harmahtava ja kauniin vihertävä sävy puuttui sytoplasmoista. Tämän perusteella voidaan päätellä, että pelkkää tumaväriaikaa muuttamalla ei löydy optimaalista värjäystulosta.

#### 7.5 Laskevan alkoholisarjan tehostaminen

Selvitimme, millaiset virhelähteet voivat aiheuttaa harmahtavaa sävyä, sytoplasmojen heikkoa värjäytymistä ja tumien epätarkkuutta. Apulaisosastonhoitaja Kaija Halonen ehdotti laskevan alkoholisarjan tehostamista. Näytteiden valmistamisessa käytetään PEG-fiksatiivia, jonka pitäisi liueta pois soluista laskevan alkoholisarjan aikana. A-ohjelmassa laskeva alkoholisarja oli aika lyhyt: näytteitä pidettiin vain hetken aikaa 70-prosenttisessä etanolissa ja sen jälkeen 15 sekunnin ajan 50-prosenttisessä etanolissa.



Jos näytteet eivät ole riittävän pitkään laskevassa alkoholisarjassa ennen tumaväriä, PEG-fiksatiivi ei pääse liukenemaan soluista, mikä estää väriaineiden pääsyn soluihin. Solut voivat muuttua harmaan utuisiksi, tumat epätarkoiksi ja sytoplasma värjäytyvyys epätasaiseksi (Hellman 2006). Laskevan alkoholisarjan tehostaminen saattaisi siis parantaa värjäytyvyttä. Lisäsimme alkuun 10 minuutin alkoholihuuhtelun 96-prosenttisessa etanolissa sekä nostimme huuteluajan 70-prosenttisessä etanolissa viiteen minuuttiin ja 50-prosenttisessä etanolissa kahteen minuuttiin.

Värjäytyvyys oli toivotun kaltainen. D-ohjelmalla värjätyt preparaattit olivat kirkkaampia kuin edellisillä ohjelmilla värjätyt preparaattit. Joidenkin solujen sytoplasmat olivat hieman vihertävämpiä kuin aikaisemmin. Vaikka näytteisiin oli tullut lisää kirkkautta, harmahtavasta sävystä ei päästy kokonaan eroon. Erityisesti lieriöepiteelisolut ja makrofagit näyttivät harmailta. Tumat värjäytyivät yleisesti ottaen melko hyvin, mutta makrofagien kohdalla tumien erottaminen oli vaikeaa. Päätimme jatkaa tehostetun laskevan alkoholisarjan käyttöä myös seuraavissa ohjelmissa, koska tulokset olivat myönteisiä.

#### 7.6 Sytoplasmavärien vaikutus värjäytyvyyteen

Tässä vaiheessa suurin ongelmamme oli sytoplasmojen huono värjäytyminen. Kokeilimme, saisiko harmaata sävyä pois ja sytoplasmojen väriä paremmin esiin pidentämällä sytoplasmavärien aikoja. Värjäysohjelmassa E pidimme saman tumaväriajan ja samat alkoholihuuhtelut kuin D-ohjelmassa, mutta muutimme sytoplasmaväri Orange G:n aikaa. Nostimme ajan alkuperäisestä 30 sekunnista yhteen minuuttiin. F-ohjelmassa kokeilimme, miltä värjäys näyttää, kun OG-6:n aika nostetaan kahteen minuuttiin.

Pidempi OG-6 aika paransi värjäystuloksia. Värit olivat kirkkaampia kuin aikaisemmin ja sytoplasmoihin saatiin enemmän kauniin vihertävää sekä turkoosia sävyä. E- ja F-ohjelmien välillä ei ollut suurta eroa, mutta päätimme silti säilyttää OG-6:n aikana kaksi minuuttia. Vertasimme värjäyksiä käytössä olevaan käsivärjykseen, johon verrattuna värjäyksemme olivat edelleen liian likaisen ja harmaan näköisiä.

Sytoplasmojen vihertävän sävyn puutteen taustalla voi olla, että sytoplasmaväri EA-50 ei toimi kunnolla (Hellman 2006). Vaihdoin väriin uuteen ja päätimme samalla nostaa EA-50:n värjäysajan kahdesta minuutista kahteen ja puoleen minuuttiin. EA-50:n

värjäysajan nostaminen teki värjäyksestä basofiilisemmän, ja siihen tuli lisää vihertävää sävyä. Erittäin verisissä näytteissä ero näkyi parhaiten. Punasolumassa muuttui vähemmän hallitsevaksi ja muut solut erottuivat paremmin punasolujen seasta, koska muiden solujen sytoplasmat värjäytyivät vahvemmin. Ohjelma G oli tähän mennessä paras, mutta harmaasävy ei ollut kadonnut kokonaan. Värjäyksestä puuttui myös riittävä terävyys ja tumien ”napakkuus”.

## 7.7 HCl-alkoholidifferentiaatio

Ilmeisesti pelkästään tuma- ja sytoplasmavärien aikoja muuttamalla ei voi saavuttaa optimaalista värjäytyvyyttä, joten kokeilimme HCl-alkoholidifferentiaatioliuoksen käyttöä H-ohjelmassa, jotta saisimme parannettua sytoplasmojen värjäytyvyyttä ja tumien terävyyttä. Differentiaatio-liuoksen tehtävänä on poistaa ylivärjäytymistä ja tuoda terävyyttä tumamorfologiaan. Tumaväri värjää tuman lisäksi solujen sytoplasmaa ja differentiaatio poistaa ylimääräistä väriä sytoplasmasta, jolloin tuma erottuu paremmin. Sytoplasmavärien pitäisi tulla paremmin esiin, kun solujen sytoplasmoista on ennen sytoplasmavärjäystä poistettu ylimääräinen tumaväri. (Bancroft – Cook: 1984, Bales 2006: 1599.)

Lisäsimme värjäysautomaattiin yksiprosenttista HCl-alkoholiliuosta. Tarkastelimme aikaisemmin tehtyjen värjäyskokeilujen raportteja ja muiden laboratorioden työohjeita. Valitsimme niiden perusteella kahden sekunnin differentiaatioajan. Aika oli monissa kokeiluissa paljon pidempi, mutta halusimme lähteä liikkeelle varovasti, ettei differentiaatioliuos poista liikaa väriä soluista. Otimme mallia Seinäjoen keskussairaalan patologian osaston värjäysohjeesta ja sijoitimme differentiaatioliuoksen vesihuuhteluiden väliin, koska vesihuuhtelu pysäyttää differentiaation, jolloin kromatiinin ja muun ympäröivän materiaalin välisestä kontrastista tulee riittävä ja vastavärjäykset onnistuvat. (Mattila 1997: 2; Seinäjoen keskussairaalan patologian osasto 1995.)

Differentiaatioliuos toi lisää terävyyttä tumarakenteisiin ja tuma-sytoplasma suhde oli helpompi erottaa. Sytoplasmaväritkin tulivat paremmin esiin ja näytteen tausta muuttui kirkkaammaksi, mutta ongelmaksi osoittautui yleinen värien haalistuminen, vaikka olimme aloittaneet varovaisella differentiaatiolla. Medite TST-40 värjäysautomaattiin ei voi ohjelmoida kahta sekuntia lyhyempää huuhteluaikaa, joten päätimme kompensoida värien haalistumista nostamalla tumaväriajan takaisin kahteen minuuttiin seuraavassa eli

I-ohjelmassa. Värjäytyvyys oli melko hyvä; tumat olivat tummempia kuin H-värjäyksessä, mutta niiden terävyys säilyi. Makrofageissa näkyi jo vihertävää sävyä. Harmahtavasävy ei ollut enää niin voimakas, mutta värjäyksen ongelmana oli sen sijaan, että värissävyt olivat hieman liian sinipunaisia ja punasolut liian rusehtavia.

## 7.8 Alkoholihiuhtelut ja nouseva alkoholisarja

Tutkimuksen tässä vaiheessa vertailimme kokeilemiamme värjäysohjeita kunnolla muiden laboratorioden värjäysohjeisiin. Huomasimme ohjeissa yhden selkeän eron: Jorvin sairaalan patologian laboratorion ohjeissa oli käytetty hyvin lyhytkestoisia alkoholihiuhteluita. Olimme jo tehostaneet laskevaa alkoholisarjaa PEG-fiksatiivin poistamiseksi näytteistä, mutta alkoholihiuhteluiden pituus värien välissä sekä nousevassa alkoholisarjassa oli vain 15 sekuntia. Muiden laboratorioden ohjeissa ajat olivat paljon pidempiä; yhdestä minuutista jopa kahteen minuuttiin.

Päätimme ottaa mallia Patologian keskuslaboratorion värjäysohjeesta, ja nostimme alkoholihiuhteluiden ajat suoraan kahteen minuuttiin (Loikkanen 2006). Tulokset olivat yllättäviä ja merkittäviä. Pääsimme eroon ongelmia tuottaneesta harmaudesta. Sytoplasmavärit tulivat kauniisti ja selkeästi esiin. Lisäksi saimme sytoplasmoihiin tavoittelemaamme vihertävää sävyä. Ainoa ongelma oli, että yksittäiset punasolut värjäytyivät haaleasti. Seuraavassa eli K-ohjelmassa kokeilimme yhden minuutin alkoholihiuhtelua. Toivoimme, että alkoholihiuhteluiden lyhentäminen ei veisi väriä punasoluista, mutta muuten värjäytyvyys säilyisi mahdollisimman samanlaisena kuin J-ohjelmassa. Alkoholihiuhteluiden lyhentäminen minuuttiin osoitti, että minuutti ei ole riittävä aika, koska värjäykseen tuli takaisin hieman ”suttuinen” vaikutelma. Punasolut värjäytyivät hieman paremmin, mutta J-värjäys vaikutti silti paremmalta.

Seuraavaksi päätimme kokeilla, säilyisikö värjäys siistin näköisenä, mutta punasolut värjäytyisivät vahvemmin, jos pitäisimme ainoastaan OG-6:n ja EA-50:n välisten alkoholihiuhteluiden ajat minuutissa ja nostaisimme muiden huuhteluiden ajat takaisin kahteen minuuttiin. Tässä vaiheessa työtä teimme virheen. Muistimme, että sytoplasmaväri OG-6 antaa punasoluille tyypillisen värin, joten lyhensimme OG-6:n jälkeisten alkoholihiuhteluiden aikaa L-ohjelmassa, jotta väri saataisiin pysymään punasoluissa parem-

min. Ajatuskuvio oli virheellinen, sillä punasolut saavat värinsä EA-50:n sisältämästä eosiinista. (Bibbo 1990: 890; Gill 2006: 107.)

Värjäyskokeilu osoitti, että ajatuskuvio oli ollut väärä. Punasolut eivät värjäytyneet paremmin ja solujen sytoplasmoista katosivat kauniit ja kirkkaat värit. Samalla värjäys menetti intensiivisyyttään ja selkeyttään. Ilmeisesti yhden minuutin alkoholihuuhtelut eivät olleet riittävän tehokkaita ylimääräisen sytoplasma-väri OG-6:n poistamiseen. Sytoplasmat eivät olleet enää läpikuultavia kuten J-ohjelmassa. J-ohjelman alkoholihuuhtelut vaikuttivat edelleen tähän mennessä parhailta. Punasolujen värjäytyminen ei ole välttämättä olennaisin asia värjäyksessä, koska esimerkiksi punasolujen morfologian arviointi ei kuulu sytologisen diagnoosin tekemiseen, joten päätimme käyttää kahden minuutin alkoholihuuhteluita jatkossa. Kokeilumme osoittivat, että alkoholihuuhteluilla on merkittävä vaikutus värjäytyvyyteen.

## 7.9 Sinistyksen tehostaminen

Kokeilimme, millä tavalla sinistyksen tehostaminen vaikuttaa värjäyksen laatuun. Aloitimme mittaamalla Jorvin sairaalan patologian laboratorion vesijohtoveden pH:n. Laboratoriossa oli InoLab-merkkinen pH-mittari, jonka toiminta perustuu kahteen elektrodiin: mittaavaan ja referenssielektrodiin. Elektrodit mittaavat liuoksen ionien määrää. InoLab-mittarin mukaan laboratorion vesijohtoveden pH oli noin kahdeksan. Mittasimme pH:n myös BDH Indicator Strips- liuskoilla, joiden toiminta perustuu liuskan värin muutoksen silmämääräiseen arviointiin. Tämän metodin mukaan pH oli seitsemän. Liuskatestin tuloksen arviointi on epätarkempaa kuin mittarin mittaustuloksen. Pidimme tulosta silti luotettavampana kuin mittarin mittaustulosta, koska veden pH:n mittaaminen mittarilla on hankalaa, koska veden ionipitoisuus on matala, jolloin mittarin toiminta on kyseenalaista. Uskoimme siis veden pH:n olevan noin seitsemän eli sinistämiseen liian hapan. (Radiometer analytical 2007.)

Jos veden pH on alhainen, sinistystä voidaan tehostaa ohjelmoimalla näytteet pidemmäksi aikaa juoksevaan veteen. Alkuperäisessä värjäysohjeessa näytteet kävivät kahdessa juoksevaa vettä sisältävässä altaassa ja molemmissa altaissa huuhtelu-aika oli kolme minuuttia. Nostimme M-ohjelmassa altaiden huuhteluajat neljään minuuttiin. Levyepiteelisolut muuttuivat värjäyksessä liian hailakoiksi. Sinistävää vaikutusta ei näkynyt

selkeästi ja värjäystä oli vaikea arvioida, koska laseilla oli aikaisempaa vähemmän soluja. Vesihuuhtelu oli ollut ilmeisesti liian voimakas, koska se oli lisännyt solujen irtoamista laseilta. Päätimme palata takaisin kolmen minuutin vesihuuhteluihin.

Kirjallisuudessa (esimerkiksi Bales 2006: 1596) kerrotaan Scott's Tap Water nimisestä sinistysliuoksesta. Kokeilimme sen käyttöä, koska Suomessa yleisimmin käytetyn sinistysliuoksen eli ammoniakkialkoholin käyttö ei ole mahdollista Medite TST-värjäysautomaatissa, jos samassa koneessa halutaan värjätä gynekologisia irtosolunäytteitä. Seinäjoen sairaalan patologian laboratoriossa on käytössä Scott's Tap Water. Nuorluoto tiedusteli heiltä, miten tämä sinistysliuos on toiminut, ja kokemukset olivat olleet hyviä. Pyysimme heitä lähettämään meille liuoksen valmistusohjeet.

Liuos valmistettiin lisäämällä 40 grammaa magnesiumsulfaattia ja 7 grammaa natriumbikarboanaattia 5000 millilitraan aquaa. Jorvin sairaalan patologian laboratoriosta ei löytynyt natriumbikarbonaattia, joten tilasimme sitä Meilahden sairaalan liuoslaboratoriosta. Tilasimme natriumbikarbonaattia 2 grammaa. Päätimme valmistaa Scott's Tap Water-liuosta kuitenkin ainoastaan litran verran, koska arvioimme sen olevan riittävä määrä tarpeisiimme. Jaoimme siis Seinäjoen sairaalan patologian laboratorion värjäysohjeen ainemäärät viidellä eli lisäsimme 1000 millilitraan aquaa: 8 grammaa magnesiumsulfaattia ja 1,4 grammaa natriumbikarbonaattia.

Seinäjoella Scott's Tap Water -sinistysliuos oli värjäysohjeessa sijoitettu juoksevien vesien perään, joten mekin sijoitimme sen samaan kohtaan. Seinäjoella oli käytetty Scott's Tap Water-liuoksen jälkeen kahden minuutin aqua-huuhtelua ja päätimme ottaa heiltä mallia tässäkin. N-ohjelmassa pidimme mukana kahden sekunnin HCl-alkoholidifferentaation, koska halusimme nähdä, miten sinistysliuos toimii differentaation kanssa. Myös Seinäjoella käytetään differentaatiota sinistyksen lisäksi. (Seinäjoen keskussairaalan patologian osaston työohje 1995.) N-ohjelmassa värjäytyvyys oli hyvä ja samankaltainen kuin J-ohjelmassa. Sytoplasmat olivat hieman liian haaleita.

Halusimme myös kokeilla, tarvitaanko Scott's Tap Water-liuoksen kanssa todella differentaatioliuosta. Gill:n hematoksyliiniä voidaan käyttää sekä regressiivisesti että progressiivisesti eli differentaation käyttö ei ole välttämätöntä. Kuten differentaatioliuoksella myös sinistysliuoksella on tumarakennetta terävöittävä vaikutus, joten pelkän sinistysliuoksen käyttö saattaisi riittää hyvän lopputuloksen aikaan saamiseksi. (Bales 2006:

1593.) O-värjäys onnistui todella hyvin. Värit olivat yleisesti ottaen tummempia ja tumaväri parempi kuin N-ohjelmassa. Tumat näyttivät ”napakoilta” ja terävyys säilyi, vaikka emme käyttäneet differentaatiota. Sytoplasmat värjäytyivät myös voimakkaammin ja niiden vihertävät ja turkoosit sävyt tulivat kauniisti esiin.

## 8 VÄRJÄYSTULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

### 8.1 Värjäystulosten arviointi

Ehdimme suorittaa 15 erilaista värjäysohjelmaa ja värjätä jokaisella ohjelmalla vähintään viisi erilaista näytettä. Meillä oli jo jonkinlainen käsitys värjäyksien laadusta ennen varsinaista arviointia, koska jokaisen värjäysohjelman jälkeen olimme arvioineet alustavasti ohjelman onnistumista yhdessä Pirjo Nuorluodon ja Marketta Riihelän kanssa. Halusimme kuitenkin arvioida värjäyksiä tarkemmin, koska parasta värjäystä ei voi mielestämme valita pelkästään empiirisen vaiheen aikana tehtyjen nopeiden arvioiden perusteella. Lisäksi halusimme tietää, mitä mieltä muut patologit ja esitarkastajat ovat värjäyksistämme, ja mikä heidän mielestään on paras ohjelma.

Suunnittelimme värjäystulosten analysointia varten arviointikaavakkeen, jonka avulla Jorvin sairaalan patologian laboratorion esitarkastajat ja patologit voivat arvioida värjäyksiemme onnistumista (ks. liite 3). Arviointikaavake suunniteltiin yhdessä esitarkastaja Nuorluodon kanssa käyttäen apuna Labqualityn laaduntarkkailukierroksien arviointikaavakkeita. Loimme oman kaavakkeemme käyttäen samoja sytologisen näytteen arviointikriteerejä, joita laaduntarkkailukierroksilla käytetään. Näitä kriteerejä ovat:

- tuman terävyys
- tuman tummuus
- sytoplasman värjäytyminen
- taustan värjäytyminen
- solumorfologia.

Päätimme numeroida arvot nolasta neljään ja kuvailimme jokaista arvoa sanallisesti. Värjäyksiä arvioitiin siis seuraavalla järjestysasteikolla:

- 0 = epäonnistunut värjäys
- 1 = välttävä värjäys
- 2 = kohtalainen värjäys
- 3 = hyvä, mutta ei moitteeton värjäys
- 4 = hyvä värjäys

Värjäyksien arvioijien tehtävänä oli valita jokaiselle arviointikriteerille mielestään sopivin arvo arviointiasteikolta. Kaavakkeiden arvioijat tulkitsivat asteikon välimatka-asteikolliseksi eli osa heistä oli antanut esimerkiksi tuman terävyydelle arvion 3,5 pistettä. Saadaksemme mahdollista lisätietoa värjäyksien onnistumisesta, lisäsimme arviointikaavakkeeseen myös muuta kommentoitavaa kohdan, johon arvioija sai kommentoida värjäyksen onnistumista sanallisesti.

Arviointiasteikon käsitteleminen välimatka-asteikkona sopi meille hyvin, koska tulosten analysoimisen tavoitteena oli valita värjäysohjelma, joka on saanut eniten pisteitä ja sen löytäminen onnistui parhaiten laskemalla pisteiden keskiarvoja. Järjestysasteikollisista muuttujista ei voi laskea keskiarvoja (Ernvall ym. 2002: 15), joten tuloksia oli tarkasteltava välimatka-asteikollisina. Valitsimme keskiarvojen laskemisen myös, koska arvioijien ajanpuutteen vuoksi osan ohjelmista oli arvioinut ainoastaan kaksi henkilöä ja osan oli arvioinut kuusi henkilöä, joten emme voineet esimerkiksi laskea pisteitä yhteen, koska kaikista ohjelmista ei ollut yhtä paljoa havaintoja.

Värjäyksen arvioinnin hitauden vuoksi meidän piti rajata arvioitavien värjäyksien määrää. Sovimme, että varsinainen arviointi aloitetaan G-ohjelmasta, koska sitä edeltävät ohjelmat olivat selvästi niin huonoja, että niillä ei olisi todennäköisesti mahdollisuutta tulla valituksi parhaaksi ohjelmaksi. Riihelä ja Nuorluoto arvioivat ohjelmat G-ohjelmasta O-ohjelmaan asti. Heidän arvioiden mukaan värjäykset J, N ja O olivat parhaita ja annoimme näiden värjäyksien lasit neljälle muulle henkilölle arvioitavaksi (ks. Taulukko 5). Heistä kaksi olivat patologeja ja kaksi olivat esitarkastajia. Sovimme, että vaikka G-ohjelmalla oli värjätty kymmenen näytettä, niistä arvioitaisiin ainoastaan viisi, koska muilla arvioinnissa mukana olevilla ohjelmilla oli värjätty myös vain viisi näytettä.

TAULUKKO 5. Taulukossa näkyy arvioijien, näytteiden ja arviointikaavakkeiden määrät.

Värjäysohjelma	Arvioijien määrä	Arviotavien näytteiden määrä	Arviointikaavakkeiden määrä
G	2	5	10
H	2	5	10
I	2	5	10
J	6	5	30
K	2	5	10
L	2	5	10
M	2	5	10
N	6	5	30
O	6	5	30
			Yhteensä 150 kpl

Tarkastelimme värjäystuloksia tekemällä erilaisia taulukoita SPSS-tilasto-ohjelman avulla. Syötimme ensin tulokset havaintomatriisiin. Tuloksia oli yhteensä 150 kappaletta, joten tutkimusaineistomme oli melko laaja. Jokaisen värjäyksen kohdalla arvioitiin viittä erilaista näytettä. Jokainen arviotava värjäys sai aina yhdeltä arvioijalta näyttemäärän vuoksi viisi arviota.

Laskimme ensin näiden arvioiden keskiarvon, jolloin saimme tulokseksi kunkin arvioijan tietylle värjäykselle antamien kaikkien pisteiden keskiarvon. Seuraavaksi laskimme värjäyksille niiden kaikilta arvioijilta saamien pisteiden keskiarvon. Näin saimme jokaisen värjäyksen kokonaispisteiden keskiarvot tietoomme ja niiden avulla pystyimme järkevästi vertailemaan värjäyksiä toisiinsa. Käytämme tuloksia analysoidessamme kaikkien pisteiden keskiarvosta nimitystä kokonaispisteiden keskiarvo. Käytimme keskiarvojen vertailun apuna ristiintaulukointia. Kaikissa taulukoissa on käytetty samaa värikoodia: turkoosilla pohjalla olevat värjäykset ovat arvioineet vain Nuorluoto ja Riihelä, tummansinisellä pohjalla olevat värjäykset ovat arvioineet kaikki kuusi henkilöä. Parhaat pisteet on korostettu aina keltaisella.



## 8.2 Värjäystulosten paraneminen tutkimuksen edetessä

Tarkastelimme ensin SPSS-tilasto-ohjelman avulla empiirisen vaiheen etenemistä. Empiirisessä vaiheessa HCl-differentaation lisääminen vaikutti olevan merkittävä askel kohti optimaalista värjäystulosta. Differentaation vaikutus värjäyksen laatuun näkyi selvästi, kun vertasimme G- ja H-ohjelmien tuloksia toisiinsa (ks. taulukko 6). G-ohjelmassa ei siis ollut differentaatiota ja H-ohjelmaan se oli lisätty. H-ohjelmalla värjättyjen näytteiden saamien pisteiden keskiarvot kohosivat jonkin verran jokaisen arviointikriteerin kohdalla verrattuna G-ohjelmaan ja kokonaispisteiden keskiarvot nousivat G-ohjelman 2,54:stä pisteestä H-ohjelman 2,97:n pisteeseen.

Differentaation tehtävänä on parantaa tuman terävyyttä ja poistaa ylimääräistä tumaväriä solujen sytoplasmoista, jolloin sytoplasmavärit toimivat paremmin. H-ohjelmassa tuman terävyys sai 3,1 pistettä ja G-ohjelmassa 2,9 pistettä. H-ohjelma pärjäsikin paremmin, mutta suurta eroa ei ollut. Sytoplasmavärjäytymisessä ero näkyi selvemmin. G-ohjelma sai sytoplasmavärjäytymisestä arvioksi 2,6 ja H-ohjelma 3,0. Sytoplasmavärit tulivat siis paremmin esiin differentaation kanssa. Vertailimme myös H-ohjelman ja I-ohjelman keskiarvoja. H-värjäyksessä tumaväriäikana oli 1,5 minuuttia ja I-ohjelmassa aika oli kaksi minuuttia. Empiirisessä vaiheessa arvioimme kahden minuutin tumaväriajan toimivan paremmin differentaation kanssa, mutta tarkemman arvion mukaan H-värjäys voisi olla parempi. Sen kokonaispisteiden keskiarvo oli 2,97 ja I-ohjelman 2,89.

TAULUKKO 6. Differentaation vaikutus värjäystuloksiin näkyy vertailtaessa G - I-ohjelmien saamien pisteiden keskiarvoja.

Värjäys	Kokonaispisteet	Tuman tumuus	Tuman terävyys	Sytoplasmavärjäytyminen	Taustan värjäytyminen	Solun morfologia
G-värjäys (N=10)	2,5400	2,4000	2,9000	2,6000	2,3500	2,4500
H-värjäys (N=10)	<b>2,9700</b>	<b>3,0500</b>	<b>3,1000</b>	<b>3,0000</b>	<b>2,7500</b>	<b>2,9500</b>
I-värjäys (N=10)	2,8900	2,8500	<b>3,1000</b>	2,9000	<b>2,7500</b>	2,8500

Alkoholihuuhteluiden aikojen pidentäminen kahteen minuuttiin näkyy värjäyksien kokonaispisteiden keskiarvoissa (ks. taulukko 7). I-ohjelmassa, jossa ei ole vielä pidennetty alkoholihuuhteluita keskiarvo on 2,89 ja J-ohjelmassa, jossa huuhteluita pidennettiin, keskiarvo on noussut 3,12:ta pisteeseen. Alkoholihuuhteluiden pidentämisen myönteinen vaikutus tulee esiin selvemmin arvioitaessa solunmorfologiaa. I-ohjelmassa solunmor-

fologia arvioiden keskiarvo on 2,85, kun taas J-ohjelmassa arvioiden keskiarvo nousee 3,32:n pisteeseen. Alkoholihuuhteluiden alkuperäisten aikojen pidentämisen jälkeen solumorfologian keskiarvo pysyi kaikissa ohjelmissa yli kolmessa. Tarkasteltaessa taas ohjelmia, joissa on hyvin lyhyet alkoholihuuhtelut, voidaan huomata, että solumorfologian keskiarvo on jäänyt kaikissa alle kolmeen kuten I-ohjelmassa.

K-ohjelmassa kokeiltiin minuutin alkoholihuuhteluiden käyttöä, jolloin kaikkien arviointikriteerien pisteiden keskiarvo laski. Kokonaispisteiden keskiarvo laski 3,12:sta 2,97:n, joten tämän perusteella kahden minuutin alkoholihuuhteluita voidaan pitää parempina. Ohjelmassa L sytoplasmavärien eli EAn ja OG-6:n väliset alkoholihuuhtelut ovat minuutin pituisia ja muut alkoholihuuhtelut kahden minuutin pituisia. Empiirisessä vaiheessa J-ohjelma oli mielestämme parempi kuin L-ohjelma, ja Riihelä sekä Nuorluoto arvioivat J-ohjelman olevan parempi, mutta jos tarkastelemme kaikkien arviointien laskettuja keskiarvoja, L-ohjelma on parempi kuin J-ohjelma.

TAULUKKO 7. Alkoholihuuhteluiden pituuden vaikutus värjäystuloksiin näkyy vertaillaessa I - J-ohjelmien saamien pisteiden keskiarvoja.

Värjäys	Kokonaispisteet	Tuman tummuus	Tuman terävyys	Sytolasman värjäytyminen	Taustan värjäytyminen	Solumorfologia
I-värjäys (N=10)	2,8900	2,8500	3,1000	2,9000	2,7500	2,8500
J-värjäys (N=30)	3,1233	<b>3,1500</b>	3,1833	3,1167	<b>2,8333</b>	<b>3,3167</b>
K-värjäys (N=10)	2,9700	3,0000	3,1500	2,9500	2,7000	3,0500
L-värjäys (N=10)	<b>3,1500</b>	3,0000	<b>3,4500</b>	<b>3,3000</b>	2,8000	3,2000

Pyrimme tehostamaan sinistävää vaikutusta pidentämällä vesihuuhteluiden aikaa kolmesta minuutista neljään minuuttiin. Sinistämisen pitäisi näkyä tuman tummuuden ja terävyyden parantumisena. Tuman tummuudelle annettu keskiarvo nousikin 3,0:sta 3,3:n siirryttäessä L-ohjelmasta M-ohjelmaan, jossa oli pidennetty vesihuuhteluita (ks. taulukko 8). Tuman terävyys sen sijaan laski 3,45:stä 3,25:n. Lisäksi sytoplasmavärjäytyminen laski 3,3:sta 3,15:sta. Empiirisessä vaiheessa huomasimme, että M-värjäyksessä soluja irtosi laseilta enemmän kuin aikaisemmissa värjäyksissä. Arvioijat olivat myös kommentoineet, että preparaateissa on liian vähän soluja. Ilmeisesti pidennetty vesihuuhtelu oli vienyt mukanaan soluja preparaateista. Kriteeriemme perusteella tulokset eivät ole parantuneet tarpeeksi, jotta pidennettyjä vesihuuhteluita kannattaisi jatkaa solujen irtoamisen kustannuksella.

N-ohjelmassa Scott's Tap Water:n ja HCl-differentaation käyttö yhdessä ei parantanut värjäystuloksia. Tulokset olivat huonompia kuin edellisissä eli L- ja M-värjäyksissä, mutta nämä värjäykset eivät olleet saaneet arviointeja kaikilta arvioijilta. Kuitenkin N-värjäys pärjäsi huonosti myös verrattuna J-värjäykseen, jonka olivat arvioineet kaikki. Kirjallisuuden mukaan (esimerkiksi Bales 2006: 1594) Scott's Tap Water riittää tuman terävöittämiseen, eikä sen kanssa tarvita välttämättä differentaatiota. Värjäystulokset osoittivat tämän pitävän paikkansa. Tuman terävyys oli jopa parempi pelkästään Scott's Tap Water-liuosta käytettäessä kuin Scott's Tap Water-liuosta sekä HCl-differentaatiota käytettäessä. N-ohjelmassa terävyyden keskiarvo oli 3,02 ja O-ohjelmassa 3,43. Kriteereistä sytoplasman värjäytyvyys parani eniten eli sen pisteiden keskiarvo nousi 3,02:sta 3,52:n. Solumorfologiaakin parani selvästi eli pisteiden keskiarvo nousi 3,22:sta 3,58:n.

TAULUKKO 8. Erilaisten sinistysmenetelmien vaikutus värjäyksien saamien pisteiden keskiarvoihin: O-värjäyksessä käytetty sinistysmenetelmä näyttää toimivan parhaiten.

Värjäys	Kokonaispisteet	Tuman tummuus	Tuman terävyys	Sytoplasman värjäytyminen	Taustan värjäytyminen	Solumorfologia
J-värjäys (N=30)	3,1233	3,1500	3,1833	3,1167	<b>2,8333</b>	3,3167
K-värjäys (N=10)	2,9700	3,0000	3,1500	2,9500	2,7000	3,0500
L-värjäys (N=10)	3,1500	3,0000	<b>3,4500</b>	3,3000	2,8000	3,2000
M-värjäys (N=10)	3,1500	<b>3,3000</b>	3,2500	3,1500	2,8000	3,2500
N-värjäys (N=30)	3,0500	3,2000	3,0167	3,0167	2,8000	3,2167
O-värjäys (N=30)	<b>3,3133</b>	3,2000	3,4333	<b>3,5167</b>	<b>2,8333</b>	<b>3,5833</b>

### 8.3 Värjäysohjelmien pisteet arviointikriteeri- ja näytemateriaalikohtaisesti.

Halusimme tarkastella värjäyksien saamia arvioita arviointikriteerikohtaisesti, joten laskimme pisteiden keskiarvot jokaiselle arviointikriteerille. Laskimme tuman tummuudesta, terävyydestä, sytoplasman värjäytymisestä, taustan värjäytymisestä ja solumorfologiasta annettujen pisteiden keskiarvot per värjäys. (Ks. taulukko 9).

TAULUKKO 9. Värjäyksien saamien kokonaispisteiden keskiarvot arviointikriteerikohtaisesti.

Värjäys:	Tuman tummuus	Tuman terävyys	Sytolasman värjäytyminen	Taustan värjäytyminen	Solumorfologia
	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean
G-värjäys (N=10)	2,40	2,90	2,60	2,35	2,45
H-värjäys (N=10)	3,05	3,10	3,00	2,75	2,95
I-värjäys (N=10)	2,85	3,10	2,90	2,75	2,85
J-värjäys (N=30)	3,15	3,18	3,12	<b>2,83</b>	3,32
K-värjäys (N=10)	3,00	3,15	2,95	2,70	3,05
L-värjäys (N=10)	3,00	<b>3,45</b>	3,30	2,80	3,20
M-värjäys (N=10)	<b>3,30</b>	3,25	3,15	2,80	3,25
N-värjäys (N=30)	3,20	3,02	3,02	2,80	3,22
O-värjäys (N=30)	3,20	3,43	<b>3,52</b>	<b>2,83</b>	<b>3,58</b>

Tuman tummuuden suhteen näytteiden värjäytyminen sai parhaimmat arviot kolmessa viimeisessä värjäyksessä eli M-, N- ja O-värjäyksissä. Näistä eniten pisteitä eli 3,3 pistettä oli saanut M-värjäys. Tuloksen tulkinnassa on otettava huomioon, että M-värjäyksen olivat arvioineet ainoastaan Riihelä ja Nuorluoto. N- ja O-värjäykset sijoituivat arvioinneissa toiseksi samalla keskiarvolla eli 3,20:lla. Eniten pisteitä saaneiden värjäyksien pisteet olivat siis lähimpänä arviota 3 eli värjäyksiä pidettiin tuman tummuuden suhteen hyvinä, mutta ei moitteettomina.

Tuman terävyyden suhteen parhaaksi ohjelmaksi osoittautui L-värjäys, joka oli saanut tuman terävyydestä 3,45 pistettä. Tosin tämänkin värjäyksen olivat arvioineet ainoastaan Nuorluoto ja Riihelä. Toiseksi parhaiten pärjäsivät O-värjäys pisteillä 3,43 ja kolmanneksi parhaiten M-värjäys pisteillä 3,25. Kaikkien arvioimista värjäyksistä tuman terävyys tuli parhaiten esiin siis O-värjäyksessä. Tuloksista voi havaita, että piste-erot parhaimpien värjäyksien välillä ovat pieniä. Näitä värjäyksiä voidaan pitää tuman terävyyden suhteen hyvinä, mutta ei moitteettomina.

Sytolasman värjäytyvyydestä parhaimmat pisteet eli 3,52 pistettä sai O-värjäys. Tulosta voidaan pitää luotettavana, koska värjäyksen olivat arvioineet kaikki patologit ja esitarkastajat. Toiseksi parhaiten pärjäsivät L-värjäys pisteillä 3,30 ja kolmanneksi parhaiten M-värjäys pisteillä 3,15. O-värjäyksen sytolasman värjäytyvyys sijoittuisi matemaatti-

sesti pyöristettynä ryhmään hyvä värjäys. L- ja M-värjäyksien arviot sijoittuisivat molemmat luokkaan hyvä, mutta ei moitteeton värjäys.

Taustan värjäytyminen oli saanut huonoja pisteitä jokaisen värjäyksen kohdalla. Arviot vaihtelivat pääasiassa kahden ja kolmen pisteen välillä. Taustan värjäytymistä pidettiin kohtalaisena tai hyvänä, mutta ei moitteettomana. Taustan värjäytymistä arvioitiin asteikolla 0-4. Epäilimme, että osa arvioijista oli ymmärtänyt, että asteikolle merkitään, kuinka paljon tausta on värjäytynyt näytteessä tai millainen näytteen tausta on. Näytteen 303 kohdalla oli esimerkiksi mainittu useasti eri värjäyksissä, että tausta on hyvin verinen ja sen takia annettu taustan värjäytymisestä arvio 0. Arvioija oli siis arvioinut näyttää eikä värjäystä.

Solun morfologialla tarkoitettiin, miten hyvin solun eri rakenneosat tulevat esiin värjäyksessä. Osa arvioijista kertoi arvioinnin jälkeen, että he olivat käsittäneet solun morfologian tarkoittavan värjäyksen yleiskuvaa, joten tämä on otettava huomioon tuloksia tulkitessa. Solun morfologian suhteen parhaimmaksi värjäykseksi nousi O-värjäys, joka oli saanut 3,58 pistettä. Tulos oli kaikista tuloksista lähimpänä 4:sta eli hyvää värjäystä. Onnistuimme siis parantamaan värjäystuloksia eniten solun morfologian suhteen. Seuraavaksi parhaat pisteet eli 3,32 pistettä sai J-värjäys ja kolmanneksi parhaat pisteet eli 3,25 pistettä M-värjäys.

Vertailimme myös eri näyttemateriaalien värjäytymistä värjäysohjelmissa, koska erilaiset näyttemateriaalit värjäytyvät eri tavalla. Tuloksia tarkastellessamme voimme havaita, että samalla ohjelmalla värjätyt eri näytteet ovat saaneet erilaisia arviointeja (ks. taulukko 10). Hyvän värjäysohjelman pitäisi värjätä riittävän hyvin kaikkia näyttemateriaaleja, joiden värjäämiseen sitä käytetään. Suurin osa näyttemateriaaleista on saanut parhaat kokonaispistearviot O-ohjelmalla värjättäessä. O-värjäyksellä parhaiten ovat värjäytyneet virtsan irtosolunäyte numero 101, maksan ohutneulabiopsianäyte numero 202, bronkuseritenäyte numero 402 ja pleuranestenäyte numero 302.

Pleuranestenäytteistä numero 303 on sen sijaan värjäytynyt parhaiten K-, L- ja M-ohjelmilla. O-ohjelmassa tämän pleuranestenäytteen värjäytyvyys on saanut jopa kaikkien huonoimmat arviot. Näyte oli hyvin verinen ja näin ollen voidaan päätellä, että O-värjäys sopii muita huonommin veristen näytteiden värjäämiseen. Näytteen saamien pisteiden keskiarvo on 2,65 eli tulos on hyvän mutta ei moitteettoman ja kohtalaisen

värjäyksen välissä. Tulos ei ole O-ohjelman kohdallakaan huono, joten voidaan olettaa, että värjäys on kuitenkin riittävän hyvä myös veristen näytteiden värjäämiseen.

TAULUKKO 10. Näytteiden värjäytyminen eri värjäyksissä. Näyte 101 loppui L-värjäyksen jälkeen, joten ohjelmat M, N ja O on värjätty korvaavalla näytteellä 104.

Värjäys	Virtsa: näyttenumero 101(104)	ONB, Maksa: näyttenumero 202	Pleura: näyttenumero 302	Pleura: Näyttenumero 303	Bronkuserite: Näyttenumero 402
G-värjäys (N=2)	2,30	2,60	2,75	2,80	2,25
H-värjäys (N=2)	2,85	2,80	3,35	3,20	2,65
I-värjäys (N=2)	2,85	2,75	3,40	2,90	2,55
J-värjäys (N=6)	2,93	3,02	3,33	3,05	3,28
K-värjäys (N=2)	2,75	2,75	3,25	<b>3,30</b>	2,80
L-värjäys (N=2)	2,75	3,15	3,35	<b>3,30</b>	3,20
M-värjäys (N=2)	2,90	3,00	3,45	<b>3,30</b>	3,10
N-värjäys (N=6)	2,83	3,00	3,38	3,03	3,00
O-värjäys (N=6)	<b>3,57</b>	<b>3,43</b>	<b>3,48</b>	2,65	<b>3,43</b>

#### 8.4 Parhaan ohjelman valinta

Laskimme kaikkien ohjelmien kokonaispisteiden keskiarvot ja vertailimme niitä toisiinsa (ks. taulukko 11). Tämän perusteella valitsimme tilastollisesti parhaaksi ohjelmaksi värjäysohjelman, jonka pisteiden keskiarvo oli korkein. Parhaaksi ohjelmaksi osoittautui O-ohjelma, jonka kokonaispisteiden keskiarvo oli 3,31. Keskiarvo on siis lähimpänä arvoa 3, joka tarkoittaa, että värjäys on hyvä, mutta ei moitteeton. Lisäksi laskimme arvioiden mediaanin, minimin ja maksimin. O-ohjelman mediaani oli 3,6 eli suurin kaikkien värjäyksien mediaaneista.

Toiseksi parhaaksi ohjelmiksi paljastuivat yllättäen L- ja M-ohjelmat, joiden molempien keskiarvot olivat 3,15. L- ja M-ohjelmat olivat kuitenkin arvioineet vain Nuorluoto ja Riihelä, joten tilastollisesti luotettavampana tuloksena voidaan pitää kaikkien arvioijien arvioimien värjäyksien tuloksia. M-ohjelmassa vesihuuhteluiden aikoja oli pidennetty, jolloin lasit menettivät soluja. Arvokkaan näyttemateriaalin menettämisen vuoksi, emme

arvioisi M-värjäyksen kuuluvan parhaimpien värjäyksien joukkoon. J-ohjelma sijoittui kolmanneksi keskiarvolla 3,12 ja N-ohjelma neljänneksi keskiarvolla 3,05.

TAULUKKO 11. Värjäysohjelmista parhaaksi ohjelmaksi osoittautui O-ohjelma.

värjäys	Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum
G-värjäys (N=10)	2,5400	,69793	2,6500	1,30	3,40
H-värjäys (N=10)	2,9700	,58699	3,0500	1,90	3,80
I-värjäys (N=10)	2,8900	,52799	3,0000	1,90	3,80
J-värjäys (N=30)	3,1233	,65846	3,0000	1,80	4,00
K-värjäys (N=10)	2,9700	,55187	2,9500	2,00	3,60
L-värjäys (N=10)	3,1500	,50827	3,2000	2,10	3,80
M-värjäys (N=10)	3,1500	,64161	3,0500	2,00	4,00
N-värjäys (N=30)	3,0500	,61965	3,0000	1,80	4,00
O-värjäys (N=30)	<b>3,3133</b>	,74544	<b>3,6000</b>	1,40	<b>4,00</b>
Total	3,0753	,65497	3,0000	1,30	4,00

Sytologisen diagnoosin tekemisessä on tärkeintä tuman morfologian erottaminen. Tumamorfologia on kriteeri, jonka perusteella arvioidaan pääasiassa solumuutosten pahanlaatuisuuden astetta. Sytoplasman värjäytyvyyden ja yleisen solumorfologian tehtävänä on tukea tuman perusteella tehtyjä arvioita. Taustan värjäytymisellä ei ole niin paljoa merkitystä, kunhan se ei häiritse edellä mainittujen kriteerien tulkintaa. (Mattila 1997:1-2.) Tämän vuoksi otimme huomioon valitessamme parasta värjäysohjelmaa, että ohjelmalla värjäytyillä näytteillä tulisi olla hyvät arvioinnit erityisesti tuman terävyyden ja tuman tummuuden suhteen.

Laskimme värjäyksille tuman tummuudesta ja terävyydestä annettujen pisteiden keskiarvot (ks. taulukko 12). O-värjäys osoittautui tässäkin suhteessa parhaaksi värjäykseksi. Pisteiden keskiarvo oli 3,32. M-ohjelman saamien pisteiden keskiarvo oli 3,28 ja L-ohjelman pisteiden 3,23, joten pelkästään tämän kriteerin mukaan M-ohjelmaa voitaisiin pitää parempana värjäysohjelmalla. J-ohjelman ja N-ohjelman välillä järjestys säilyi samana kuin aikaisemmin: J-ohjelman pisteiden keskiarvo oli 3,18 ja N-ohjelman pisteiden 3,12.

TAULUKKO 12. O-ohjelman saamien pisteiden keskiarvo oli korkein myös tuman tummuutta ja terävyyttä arvioitaessa.

värjäys	Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum
G-värjäys, N=10	2,6500	,82664	2,6250	1,25	3,50
H-värjäys, N=10	3,0750	,70760	3,0000	2,00	4,00
I-värjäys, N=10	2,9750	,58274	3,0000	2,00	4,00
J-värjäys, N=30	3,1750	,72263	3,3750	2,00	4,00
K-värjäys, N=10	3,0750	,64603	3,0000	2,00	4,00
L-värjäys, N=10	3,2250	,53294	3,3750	2,00	4,00
M-värjäys, N=10	3,2750	,73077	3,2500	2,00	4,00
N-värjäys, N=30	3,1083	,70919	3,0000	2,00	4,00
O-värjäys, N=30	<b>3,3167</b>	,96921	<b>3,6250</b>	1,00	4,00
Total	3,1383	,75892	3,2500	1,00	4,00

### 8.5 Värjäyksien sanalliset arviot

Arviointikriteerien avulla tehdyn arvioinnin lisäksi osaan arviointikaavakkeista oli kirjoitettu sanallisia kommentteja. Osa sanallisista arvioinneista oli ristiriidassa muiden kommenttien kanssa, mikä kertoo värjäyksien arvioinnin subjektiivisuudesta. Suurin osa kommentteista liittyi erityisesti näytteen taustaan, jonka arvioiminen ei ollut ilmeisesti aivan yksiselitteistä, varsinkaan veristen näytteiden kohdalla. Näytteistä bronkuserite-näyte 202 oli hieman verinen, pleuranestenäyte 302 oli kohtalaisen verinen ja toinen pleuranestenäyte 303 erittäin verinen.

Sanallisista arvioista nousi erityisesti esiin myös useat eosinofiilien värjäytymistä koskevat myönteiset kommentit. Lähes kaikissa värjäyksissämme oli jonkin näytteen arvi-on kohdalla mainittu eosinofiilien sytoplasmojen värjäytyvän hyvin. Eosinofiilien värjäytymistä kommentoitiin todennäköisesti paljon, koska laboratorion käsivärjäysmenetelmässä niiden värjäytyminen on ollut ongelmallista. Eosinofiileista on värjäytynyt ai-noastaan tumat, ja sytoplasma on jäänyt lähes kokonaan värjäytymättä, mikä on häirin-nyt eosinofiilien tunnistamista. Taulukossa 13 esitellään tiivistetysti värjäysten saamia sanallisia arvioita.



TAULUKKO 13. Kooste sanallisista arvioinneista. M-värjäyksen kohdalla näkyy kommentteissa ristiriita.

Värjäys-ohjelma	Sanallisia arvioita
G	Verinen tausta värjäytyy hyvin/vahvasti, punasolut värjäytyvät hyvin
H	Punasolut ja eosinofiilit värjäytyvät hyvin
I	Eosinofiilit värjäytyvät hyvin
J	Verinen tausta värjäytyy haaleasti, yksittäiset punasolut värjäytyvät hyvin, nukleolit värjäytyvät punertavasti, haalea yleiskuva
K	Veri värjäytyy heikosti
L	Veri värjäytyy heikosti, raikas värimaailma, nukleolit värjäytyvät hyvin
M	Verinen tausta on liian voimakkaasti värjäytynyt, verinen tausta haaleampi kuin muissa värjäyksissä
N	Liian haalea värjäys, sytoplasmojen rajat epätarkat, lima erottuu heikosti
O	Punasolut, nukleolit ja eosinofiilit värjäytyvät erittäin hyvin, tumat tummia

## 8.6 Värjäytyvyyden arvioinnin subjektiivisuus

Optimaalisen värjäystuloksen subjektiivinen kokeminen näkyi selkeästi värjäystuloksissa ja tuloksien suurissa hajontaluvuissa. Optimaalisia värjäystuloksia on yhtä monta kuin värjäyksien katsojia. Mielenpiteet vaihtelivat välillä hyvin paljon. Mielenpiteiden vaihtelua näkyi erityisesti ammattiryhmien välillä (ks. taulukko 14).

Esitarkastajat arvioivat värjäyksiä vähän tarkemmin ja kriittisemmin. Patologit eivät pitäneet eri värjäyksiä niin paljoa toisistaan poikkeavina. Tämän syynä saattaa olla, että esitarkastajat mikroskoipoivat aina koko näytelasin läpi ja patologit katsovat pelkästään preparaattiin ympyröityjä epänormaaleja muutoksia. Kun preparaatti pitää mikroskopioida kokonaan sen katsominen saattaa olla raskasta, jos värjäys on huono. Lisäksi hyvän värjäyksen merkitys korostuu, koska epänormaalit muutokset pitää pystyä erottamaan kaiken muun näytemateriaalin keskeltä.

TAULUKKO 14. Ammattiryhmien väliset erot värjäyksien arvioinnissa näkyvät jokaisen värjäyksen kohdalla.

Värjäys:	Värjäyksien kokonaispisteiden keskiarvot	
	Patologi	Esitarkastaja
G-värjäys	3,12	1,96
H-värjäys	3,44	2,50
I-värjäys	3,28	2,50
J-värjäys	3,44	2,81
K-värjäys	3,36	2,58
L-värjäys	3,56	2,74
M-värjäys	3,70	2,78
N-värjäys	3,24	2,86
O-värjäys	3,72	2,91

### 8.7 Värjäystulosten yhteenveto

Värjäystuloksista voidaan päätellä, että jokainen värjäysohjelman muuttuja, jota tarkastelimme taulukoiden avulla eli differentaation lisääminen, alkoholihiuhteluiden aikojen pidentäminen ja sinistämisen tehostaminen vaikuttivat värjäytyvyyteen. Värjäysohjelmien pistemäärissä on kuitenkin suhteellisen vähäisiä eroja todennäköisesti sen vuoksi, että itse ohjelmienkin väliset erot olivat pieniä. Kussakin värjäysohjelmassa oli muutettu vain yhtä muuttujaa kerrallaan. Liitteessä 4 esitellään näytekohtaisesti kuvat värjäyksistä A, G, I, J, N ja O ja sitä tarkastellessa voi havaita, että erot värjäysten välillä ovat tosiaan pieniä, mutta ne ovat kuitenkin havaittavissa. Liitteen 5 taulukkoon on koottu tuloksista yhteenveto.

Parhaaksi ohjelmaksi osoittautui suhteellisen vähäisistä eroista huolimatta O-värjäysohjelma, joka esitellään liitteessä 6. Sen saamat kokonaispisteet sekä pisteet sytoplasman värjäytymisen, solumorfologian ja taustan suhteen olivat parhaimpia. Myös tumman tummuuden ja terävyyden yhteisen keskiarvon suhteen O-värjäys oli paras. Lisäksi O-ohjelman kohdalla pistemäärät olivat selvästi korkeampia kuin muiden ohjelmi-

en pisteet suhteessa muiden ohjelmien välisiin eroihin. Kaikkien värjäyksien arvioinnit sijoittuivat pääasiassa välille kohtalainen värjäys ja hyvä värjäys. Ilmeisesti useanlaisella värjäysohjelmalla saadaan aikaan tyydyttäviä värjäystuloksia. Värjäysohjelmia voidaan säätää lähes loputtomiin, koska Papanicolaou-värjäyksessä on niin monta muuttujaa, joihin voidaan vaikuttaa. Toisaalta värjäyksen arviointi on niin subjektiivista, että ohjelman hienosäätäminen loputtomiin ei ole välttämättä kannattavaa. Jokaisen mielestä optimaalista värjäystä on tuskin mahdollista löytää. Tärkeintä on, että värjäystulokset ovat kaikkia tyydyttäviä, ja niiden pohjalta voidaan tehdä luotettavaa sytologista diagnostiikkaa.

## 9 TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS

Tutkimuksen validiteetti tarkoittaa, kuinka hyvin tutkimuksessa on onnistuttu mittaamaan juuri sitä, mitä pitikin mitata (Heikkilä 2001: 186). Tutkimuksemme tarkoituksena oli kokeilla, millä tavalla eri muuttujat vaikuttavat värjäyksen laatuun, ja sen kautta löytää optimaalinen värjäysohjelma. Tutkimuksen validiteettia lisää se, että muutimme jokaisessa värjäysohjelmassa vain yhtä muuttujaa kerrallaan. Näin pystyimme takaamaan, että tiedämme, minkä muuttujan vaikutuksesta värjäystuloksessa nähtävä muutos on syntynyt.

Pyrimme lisäämään tutkimuksen validiteettia ja luotettavuutta vakioimalla tutkimuksen työolot. Valmistimme näytepreparaatit aina samalla tavalla ja työskentelimme samassa työpisteessä sekä käytimme samoja välineitä tutkimuksen alusta loppuun. Suoritimme kaikki työvaiheet ohjeiden mukaisesti. Lisäksi jaoimme näytepreparaattien valmistamisen työvaiheet keskenämme. Toinen meistä pipetoi aina näytteen näytekammioon ja toinen huolehti PEG-fiksatiivin sekä 50-prosenttisen etanolin pipetoimisesta. Näin vältimme erilaisesta pipetointikäsiälästä aiheutuvat muutokset preparaattien laadussa.

Pienen rajaajan ansiosta pystyimme käyttämään samoja näytteitä koko tutkimuksen ajan, lukuun ottamatta näytettä numero 101, joka loppui 12. värjäyksen jälkeen. Samojen näytteiden käyttäminen lisää tutkimuksen validiteettia, koska tällöin voimme olla varmoja, että emme tarkastele erilaisesta näytemateriaalista aiheutuvaa muutosta, vaan tutkimme juuri haluttuja muuttujia. Jouduimme värjäämään kolme viimeistä ohjelmaa käyttäen uutta virtsanäytettä, jonka numeroimme 104:ksi. Tämä vaikuttaa tutkimuksen

luotettavuuteen arvioitaessa virtsanäytteiden värjäytymistä. Värjäysohjelmien laadun arvioinnin kokonaisuutta ajatellen yhden näytteen vaihtuminen toiseksi samoja soluja sisältäväksi näytteeksi ei kuitenkaan juuri vaikuta luotettavuuteen. Näyttemateriaalin valitseminen yhdessä esitarkastajan ja patologin kanssa lisää myös tutkimuksen luotettavuutta, koska he osasivat valita tutkimukseen näytteitä, joiden perusteella värjäytyvyyttä kannattaa arvioida.

Vaihdoimme tai suodatimme värjäyksessä käytettävät liuokset työohjeiden mukaisesti kerran viikossa. Suodatimme värit ja vaihdoimme uusiin liuoksiin alkoholit, HCL-alkoholidifferentiaaliuoksen sekä ksyleenin. Aquat vaihdoimme päivittäin. Papanicolaou-värjäyksessä käytettävien liuosten huoltotiheys vaihtelee niillä värjättävien näyttemäärien mukaan. Meidän värjäämämme näyttemäärät olivat pieniä, enimmillään noin 15 näytettä päivässä, joten viikon huoltotiheys muiden kuin aquan kohdalla oli todennäköisesti riittävä.

Empiiristä vaihetta suorittaessamme värjäysohjelman näytepreparaatit arvioitiin aina alustavasti, jotta osaisimme kehittää uuden ohjelman oikeaan suuntaan. Riihelä ja Nuorluoto arvioivat lasit yleensä yhdessä, mutta näin ei tehty aivan kaikkien värjäyksien kohdalla, sillä Riihelä ei töidensä vuoksi ehtinyt arvioida jokaista värjäystä ja Nuorluoto oli muutaman päivän koulutuksessa. Tällöin värjäysohjelman lasit arvioi vain toinen heistä. Tämä vaikuttaa tutkimuksen luotettavuuteen, sillä värjäyksen arviointi on subjektiivista. Vaikutus näkyy kuitenkin vain tutkimuksen empiirisen vaiheen etenemisessä, koska emme käyttäneet empiirisessä vaiheessa saatuja arvioita tulosten analysointivaiheessa, jossa valitsimme parhaan värjäysohjelman.

Kaikki arvioijat eivät nähneet jokaista arvioitavaa värjäystä. Tutkimuksemme olisi ollut luotettavampi, jos hekin olisivat katsoneet kaikki värjäykset G-värjäyksestä O-värjäykseen, mutta aika ei valitettavasti riittänyt. Uskomme kuitenkin, että saamamme aineisto riittää tutkimuksemme tarpeisiin, sillä ohjelmat J, N ja O olivat kaikkien arvioijien mielestä riittävän hyviä. Tutkimuksemme tavoitteena oli kehittää paras värjäysohjelma ja mielestämme O-ohjelman valintaa parhaaksi voidaan pitää luotettavana, koska O-ohjelma sai parhaimmat pisteet, kun vertailimme niiden värjäyksien keskiarvoja, jotka olivat saaneet arviot kaikilta patologeilta ja esitarkastajilta. O-ohjelma oli paras myös vertailtaessa aivan kaikkien eli värjäyksien G-O pisteiden keskiarvoja toisiinsa.

Tutkimuksen validiteettiin vaikuttaa, miten onnistuneita arviointikaavakkeen kysymykset ovat ja voidaanko, niiden avulla saada vastaus tutkimusongelmaan (Heikkilä 2001: 186). Osa arvioijista oli ymmärtänyt arviointikaavakkeemme kriteerit ilmeisesti väärin, mikä vähentää tutkimuksen luotettavuutta. Meidän olisi pitänyt selittää tarkemmin arviointikaavakkeessa, mitä kriteerit tarkoittavat. Arvioijat olivat kuitenkin pyrkineet käsityksemme mukaan vastaamaan kysymyksiin mahdollisimman hyvin ja huolellisesti. Osa myös kysyi meiltä, jos jokin kriteeri oli epäselvä. Saimme siis osan virhetulkinnoista korjattua. Löysimme myös vastauksen tutkimusongelmaamme arviointikaavakkeemme arviointikriteerien avulla eli selvitimme, mikä värjäyksistä on optimaalisin.

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida myös reliabiliteetin kannalta. Sisäinen reliabiliteetti tarkoittaa, että samaa tilastoyksikköä mitattaessa useampaan kertaan saadaan aina samat mittaustulokset (Heikkilä 2001: 187). Värjäyksien arviointi on hyvin subjektiivista ja arvioijat kertoivat, että he olivat katsoneet samoja laseja useampana päivänä, koska heistä tuntui, että mielipide värjäyksistä muuttui. Tutkimuksen sisäistä reliabiliteettia lisää, että he katsoivat näytelaseja useampaan kertaan ennen kuin antoivat lopullisen arvion. Hyvää sisäistä reliabiliteettia on kuitenkin mahdotonta saavuttaa, koska värjäyksien arvioiminen on aina subjektiivinen kokemus. Täysin toistettavia tuloksia on todennäköisesti mahdotonta saada tämän kaltaisessa tutkimuksessa.

Reliabiliteettia voidaan tarkastella myös ulkoisen reliabiliteetin kannalta, mikä tarkoittaa, että mittaukset ovat toistettavissa myös muissa tutkimuksissa ja tilanteissa (Heikkilä 2001: 187). Tutkimuksemme ulkoista reliabiliteettia lisää, että olemme raportoineet tutkimuksemme kulun tarkasti. Raportin avulla tutkimuksemme pystyy todennäköisesti suorittamaan samalla tavalla uudestaan. Ulkoista reliabiliteettia alentaa sen sijaan se, että täysin samoja näyttemateriaaleja, joita käytimme, ei ole enää uudestaan saatavilla. Lisäksi esimerkiksi vesijohtoveden pH saattaa vaihdella jonkin verran vuodenajan mukaan ja pH:n muutokset vaikuttavat aina värjäytyvyyteen.

## 10 POHDINTA

Tutkimuksemme tavoitteena oli kehittää Jorvin sairaalan patologian laboratorioon optimaalisen värjäystuloksen antava Papanicolaou-värjäysohjelma sytosentrifugivalmisteil-

le. Optimaalinen tarkoittaa ihanteellista (Nurmi ym. 2004: 313) eli tavoitteenamme oli kehittää Jorvin sairaalan patologian laboratoriossa tällä hetkellä vallitseviin olosuhteisiin soveltuva Papanicolaou-värjäys, joka miellyttää tämän hetkistä henkilökuntaa. O-ohjelma sai keskiarvoltaan suurimman pistemäärän arviointikaavakkeillamme mitattuna ja se antaa hyvän, mutta ei moitteetonta värjäystuloksen. Värjäyksiä arvioinnin subjektiivisuuden vuoksi olisi ollut erikoista, jos värjäyksiemme joukosta olisi löytynyt yksi ohjelma, joka olisi ollut kaikkien arvioijien mielestä täydellinen. O-ohjelma sai kuitenkin parhaimmat pisteet ja näin ollen sitä voidaan pitää ihanteellisena värjäysohjelmana Jorvin sairaalan patologian laboratorion tarpeisiin.

Tutkimuksemme toi myös tietoa värjäykseen vaikuttavista tekijöistä. Huomasimme esimerkiksi, että pelkkiä tumaväri- ja sytoplasma-aikoja muuttamalla on mahdollista päästä optimaaliseen värjäystulokseen. Viimeinen ohjelma, jossa oli käytetty optimaalisen värjäystuloksen etsintään pääasiassa vain värien aikojen vaihtelua, oli G-ohjelma. Värjäyksiä varsinaisessa arvioinnissa se sijoittui välttävän värjäyksen ja hyvän, mutta ei moitteettoman värjäyksen väliin. Optimaalisen värjäystuloksen saavuttamiseen tarvitaan siis ilmeisesti, alkoholihuuhteluiden aikojen sopivaksi säätämistä ja differentaatio- tai sinistysliuoksen käyttöä.

Tutkimme myös, saadaanko tumat erottumaan sytoplasmoista riittävän terävästi ilman differentaatiota. Ennen differentaation käyttöä G-ohjelmassa tuman terävyys oli saanut huonot arviot ja tulokset kohosivat selvästi differentaation lisäämisen jälkeen tuman tummuuden, terävyyden sekä sytoplasman värjäytymisen suhteen. Näiden arvioiden kohotessa voimme päätellä, että tumat erottuivat paremmin sytoplasmoista differentaation kanssa. Vaikuttaisi siltä, että tuman riittävään erottamiseen sytoplasmoista tarvitaan differentaatiota, mutta lopullinen tulos ei ollut näin yksinkertainen. Tulokset osoittautuivat mielenkiintoisiksi, kun käytimme värjäysohjelmassa pelkkää Scott's Tap Water – sinistysliuosta. Tuman tummuus, terävyys ja sytoplasman värjäytyvyys olivat parempia pelkän sinistysliuoksen kanssa kuin sinistysliuoksen ja differentaation kanssa. Tumien erottaminen sytoplasmoista ilman differentaatiota on siis mahdollista, jos käytetään Scott's Tap Water – sinistysliuosta.

Scott's Tap Water-sinistysliuoksen käyttö paransi ratkaisevasti värjäystuloksia. Liuoksen käytöstä on ilmeisesti vähän kokemuksia Suomessa, koska useimmissa laboratorioista käytetään ammoniakki-alkoholia sinistysliuoksena. Ehdimme tutkia Scott's Tap

Water:n käyttöä ainoastaan kahdessa värjäysohjelmassa, joissa kokeilimme, miten tämä sinistysliuos toimii HCl-differentaation kanssa ja miten ilman sitä. Emme siis kokeilleet esimerkiksi, miten sinistysajan muuttaminen olisi vaikuttanut tuloksiin. Tämän tutkimista voisi jatkaa tulevaisuudessa. Lisäksi tutkia voisi, kuinka pitkät vesihuuhteluajat ovat tarpeen Scott's Tap Water:n kanssa. Scott's Tapwater-sinistysliuoksen käytön tutkiminen kokonaisuudessaan voisi olla hyvä jatkotutkimusaihe opinnäytetyöllemme.

Saimme tutkimusta tehdessämme ja tuloksia analysoidessamme myös paljon muuta lisätietoa siitä, miten värjäyksen kehittämistä eteenpäin voidaan halutessa jatkaa. Huomasimme empiirisessä vaiheessa sekä tuloksia analysoidessamme, että alkoholihuuhte-luiden pituudella on erittäin suuri vaikutus värjäytyvyyteen. Papanicolaou-värjäyksessä, jota kehittelimme, oli yksitoista eri alkoholihuuhtelua ja pelkästään näistä kahden huuh-telun ajan pituuden muuttaminen vaikutti huomattavasti värjäytyvyyteen. Erilaisilla al-koholihuuhteluiden pituuksilla voitaisiin tehdä siis paljon uusia kokeiluja ja tätä kautta ehkä löytää vielä parempia värjäysohjelmia.

Värjäysohjelmat L ja M saivat hyviä arviointeja tulosten analysointivaiheessa. Näitä ohjelmia olivat arvioineet ainoastaan Nuorluoto ja Riihelä. Jos muilta patologeilta ja esitarkastajilta löytyy aikaa ja kiinnostusta, suosittelisimme myös näihin ohjelmiin pe-rehtymistä. M-ohjelman kohdalla on tosin otettava huomioon solujen lisääntynyt irtoa-minen lasilta, jota ei pystynyt arvioimaan arviointikriteeriemme avulla, joten tämä ei tullut selkeästi esiin tuloksissa. L-ohjelmaa ei pidetty kovin hyvänä empiirisessä vai-heessa, mutta varsinaiset arviot olivat yllättävän hyviä. Tämän vuoksi erityisesti L-ohjelmaa kannattaisi tarkastella lisää.

Saavutimme opinnäytetyössämme mielestämme hyvin asettamamme tavoitteet eli on-nistuiimme kehittämään Jorvin sairaalan patologian laboratorioon käyttökelpoisen vär-jäysohjelman, jonka avulla voidaan todennäköisesti siirtyä käsivärjäysmenetelmästä au-tomaattiseen värjäysmenetelmään. Empiirinen vaihe onnistui sujuvasti, kiitos laborato-rion asiantuntevan ja avuliaan henkilökunnan. Erityisesti haluamme kiittää Pirjo Nuor-luotoa, Marketta Riihelää ja Kaija Halosta, joiden apu oli korvaamatonta.

Saimme myös kerättyä Papanicolaou-värjäyksestä tavoitteiden mukaisesti paljon tietoa teoriaosuuteen. Uuden tiedon löytäminen oli tosin vaikeaa, koska Papanicolaou-värjäys menetelmä on vanha, ja nykyään tutkimuksissa käsitellään enemmän uudempien mene-

telmiä. Onnistuimme kuitenkin löytämään joitakin uusia artikkeleja Papanicolaou-värjäyksestä, joista löytyi uutta tietoaakin. Papanicolaou-värjäyksen uusien variaatioiden tarkempi tutkiminenkin voisi olla myös yksi tarpeellinen jatkotutkimusaihe työnllemme. Uskomme, että työmme kirjallisesta osuudesta voi olla hyötyä Jorvin sairaalan patologian laboratorion henkilökunnalle, jos he haluavat vielä hienosäätää kehittämämme värjäysohjelmaa. Lisäksi tiedoista voi olla hyötyä, jos jo käyttöön otetun ohjelman värjäystulokset muuttuvat esimerkiksi vesijohtoveden pH:n vaihtelun vuoksi.

Aihepiirin rajaaminen aiheutti ongelmia työssä. Periaatteessa olisimme voineet keskittyä teoriaosuudessa ainoastaan Papanicolaou-värjäykseen, mutta värjäyksen teorian ja työmme empiirisen vaiheen ymmärtäminen olisi ollut vaikeaa ilman tietoa sytologisesta diagnostiikasta ja siinä käytettävistä näyttemateriaaleista. Tuloksien käsitteleminen oli haastavaa, koska tutkimusaineistomme oli laaja ja arviointikaavake oli alun perin suunniteltu järjestysasteikolliseksi. Arviointien käsittely järjestysasteikollisesti osoittautui mahdottomaksi, koska osa arvioijista oli käsittänyt arviointiasteikon välimatka-asteikolliseksi ja värjäyksiä oli arvioinut vaihteleva määrä arvioijia. Parhaan ohjelman selvittäminen ei olisi onnistunut analysoimalla tuloksia järjestysasteikollisesti, vaan jouduimme käsittelemään arvioita välimatka-asteikollisina, jotta pystyimme keskiarvoja laskemalla selvittämään eniten pisteitä saaneen ohjelman.

Teimme opinnäytetyön parityönä. Parityöskentelymme on ollut alusta alkaen tehokasta ja rakentavaa. Olemme oppineet paljon parityöskentelystä ja työnjaon sekä kommunikation merkityksestä. Yhteistyömme on ollut saumatonta ja toimivaa. Olemme oppoineet koko ajan toistemme kirjoittamia tekstejä, ja näin tuoneet molempien näkökulman esiin työn kaikissa osissa. Yhdessä työskennellessä olemme oppineet hyödyntämään toistemme vahvuuksia. Työn tekeminen on ollut ajoittain hieman stressaavaa ja uuvuttavaa, mutta olemme mielestämme selviytyneet pääasiassa hyvin.

Kokonaisuudessa opinnäytetyön tekeminen oli hyvin opettavaista ja mielenkiintoista. Tarvitsimme työtä tehdessä lähes kaikkien oppiaineiden tietoja, joita olimme bioanalyttikko-opintojen aikana opiskelleet. Sytologinen diagnostiikka ja näyttemateriaalien käsittely liittyivät ihmisen anatomiaan ja solubiologiaan. Papanicolaou-värjäyksen teoriaa ja näytteiden valmistusta käsitellessämme kertosimme monia kemiaan, fysiikkaan ja biokemiaan liittyviä tietoja. Lisäksi saimme työtä tehdessämme tietenkin paljon uutta syventävää tietoa patologiasta ja erityisesti sytologiasta.



## KIRJALLISUUS

- Aho, Heikki. 2000: Sytologiset värjäykset. Teoksessa Tenhunen, Raimo (toim.): Moodi. 4-5. Helsinki: LabQuality Oy. 142–145.
- Bancroft, John D. – Cook, Harry C. 1984: Routine morphological staining. Teoksessa: Manual of Histological Techniques. New York: Churchill Livingstone. 18–22.
- Bancroft, John D. – Cook, Harry C. 1994: Routine morphological staining. Teoksessa: Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application. New York: Churchill Livingstone. 23–30.
- Bales, E. Carol 2006: Techniques in Diagnostic Cytology. Teoksessa Koss, Leopold G. (toim.): Koss' Diagnostic Cytology and it's Histopathologic Bases. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins. 1570–1605.
- Bibbo, Marluce 1991: Comprehensive Cytopathology. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Bjålie, Jan G. - Haug, Egil- Sand, Olav - Sjaastad, Oystein V. - Toverud, Kari C. 1999: Ihminen - Fysiologia ja anatomia. Helsinki: WSOY.
- Couture, Rick – Hafer, Laurie J. 2004: Staining Methods: Nucleus and Cytoplasm. Teoksessa Wulff, Sonja (toim.): Guide to Special Stains. California: DakoCytomation. 24–28
- Dapson, RW. 2005: Dye-tissue interactions: mechanisms, quantification and bonding parameters for dyes used in biological staining. Teoksessa Nettleton, G.S (toim.): Biotechnic Histochemistry. Vol. 80(2). Louisville, Kentucky: Taylor&Francis. 49–72.
- Earle, Elizabeth 2000: Automated Stainers. Laboratory Medicine. Volume 31. Number.1. USA: Phoenix. 30–36.

- Ernvall, Reijo – Ernvall, Sirpa – Kaukkila, Hanna-Sisko 2002: Tilastollisia menetelmiä sosiaali- ja terveystieteille. Juva: WS Bookwell Oy.
- Gamble, Marilyn - Wilson, Ian 2002: The Hematoxylin and Eosin. Teoksessa Bancroft, John D. - Gamble, Marilyn (toim.): Theory and Practice of Histological Techniques. Fifth edition. China: Churchill Livingstone. 125–137.
- Gill, Gary W. 2006: Enviro-Pap: An Environmentally Friendly, Economical, and Effective Pap Stain. Labmedicine. Volume 37. Number 2. February 2006. USA. Indianapolis.
- Heikkilä, Tarja 2001: Tilastollinen tutkimus. 3. painos. Helsinki: Oy Edita Ab.
- Hellman, L. 2006: Papanicolaou-värjäys konevärjäys ylläytöksen näytteille. Työohje. HUSLAB. Patologian vastuualue. Kätilöopisto patologian laboratorio. Helsinki.
- Hellman, L. 2004: Ongelmia Papanicolaou-värjäyksessä. Työohje. HUSLAB. Kätilöopisto. Patologian vastuualue. Patologian laboratorio. Helsinki.
- Holliday, Jamie M. 2004: Fixation and Tissue Processing. Teoksessa Wulff, Sonja (toim.): Guide to Special Stains. California: DakoCytomation. 17–23.
- Hopwood, David 2002: Fixation and fixatives. Teoksessa Bancroft, John D – Gamble, Marilyn (toim.): Theory and Practice of Histological Techniques. 5.painos. China: Churchill Livingstone. 63–76.
- Horobin, Richard W. 2002: Theory of staining and its practical implications. Teoksessa Bancroft, John D – Gamble, Marilyn (toim.): Theory and Practice of Histological Techniques. Fifth Edition. China: Churchill Livingstone. 109–123.
- Horobin, Richard W: Trouble-Shooting the routine Stains. Dept of Biomedical Science, The University of Sheffield. England: Merc.

- Hyypijev, S. – Manninen, P. 2006: Gelatiinilasit. Työohje. HUSLAB. Jorvin sairaala. Patologian laboratorio. Espoo.
- Karttunen, Tuomo - Ylermi, Soini- Vuopala, Katri 2005: Tautioppi. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Koivuniemi, Ari 1994: Ohutneulabiopsit. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia. Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kanditaattikustannus Oy. 345–604
- Koivuniemi, Ari – Stenbäck, Frej: 1994: Yleistä sytologiaa. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia. Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kanditaattikustannus Oy. 1–22.
- Koivuniemi, Ari - Tyrkö, Juhani 1994: Virtsan irtosolututkimukset. Teoksessa Koivuniemi, Ari (toim.): Kliininen sytologia. Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kanditaattikustannus Oy. 269–296.
- Laiholan Sue – Salminen Susan 2001: Sytologian työohjeet. Työohje. HUSLAB. Patologian vastuualue. Jorvin sairaala. Patologian laboratorio. Espoo.
- Llewellyn, Bryan D. 2006: Stainsfile. Verkkodokumentti. Päivitetty joulukuussa 2006. <<http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html>>. Luettu 15.9.2007.
- Loikkanen, Mirja 2006: Papanicolaou-värjäys. Työohje. HUSLAB. Patologian vastuualue. Meilahden patologian laboratoriot. Patologian keskuslaboratorio. Sytologia. Helsinki.
- Mattila, Anne 1997: Papanicolaou- ja May-Grunwald-Giemsan värjäysmenetelmät. Luentomoniste. Suomen histotekniikan yhdistyksen koulutuspäivä 12.4.1997. Turku.
- Medite TST 40 värjäysautomaatti. Käyttöohje. Vantaa: Sairtec Oy.

- Morse, Anne 2002: Diagnostic Cytopathology; Specimen Collection and Preparation. Teoksessa Bancroft, John D- Gamble, Marilyn(edit): Theory and Practice of Histological Techniques. Fifth edition. China: Chuchill Livingstone. 621–635.
- Nurmi, Timo – Rekiaro, Ilkka – Rekiaro, Päivi – Sorjanen, Timo 2004: Suuri sivistys-sanakirja. Kuudes painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Papanicolaou Society of Cytopathology 2004; Sigma-Aldrich Co 2007. Verkkodokumentti. Päivitetty 20.8.2007. <<http://www.papsociety.org/index.html>> Luettu 10.9.2007.
- Radiometer analytical 2007: pH Theory and Practice. Verkkodokumentti. <[http://www.radiometer-analytical.com/en\\_company.asp](http://www.radiometer-analytical.com/en_company.asp)> Luettu 25.10.2007.
- Sakura Autosmear TM Sytosentrifugi. Käyttäjän ohjekirja. Espoo: Algol Pharma Diagnostiikka.
- Sakura Finetek Europe B.V. 2005: Sakura Cyto-Tek Cytosentrifuge. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.3.2007 <<http://www.sakuraeu.com/cms/products/subcat/Flyer%20CytoTek.pdf>> Luettu 12.5.2007
- Seinäjoen keskussairaalan patologian osasto 1995: Papanicolaoun konevärjäys sytologisille näytteille-SAKURA DRS 2000. Työohje. Seinäjoki.
- Stevens, Alan 1980: The hematoxylin. Teoksessa Bancroft, John D. (toim.) – Stevens, Alan: Theory and Practice of Histological Techniques. New York: Churchill Livingston. 85– 93.
- Timonen, Tuomo 1998: Sytologia. Teoksessa Rantala, Immo – Lountamaa, Kari: Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino. 81–87.
- Taskinen, Eero 1994: Pleura- ja askitesnesteen irtosolututkimukset. Teoksessa Koivunimi, Ari (toim.): Kliininen sytologia. Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kanditaattikustannus Oy. 297–318.

- Taskinen, Eero 1994: Hengityselinten irtosolututkimukset. Teoksessa Koivunimi, Ari (toim.): Kliininen sytologia. Irtosolu-, harjairtosolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset. Forssa: Kandidaattikustannus Oy. 143–239.
- Takahashi, Masayoshi 1971: Coloured Atlas of Cancer Cytology. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Titford, M 2005: The long history of hematoxylin. Teoksessa Nettleton, G.S (toim.): Biotechnic Histochemistry. Vol. 80(2). Louisville, Kentucky: Taylor&Francis. 73–78.
- Tukiainen, Pentti 2000: Ysköstutkimukset. Teoksessa Kinnula, Vuokko - Laitinen, Lauri A.- Tukiainen, Pentti (toim.): Keuhkosairaudet. Jyväskylä: Duodecim. 227–229.
- Tukiainen, Pentti 2000: Bronkoskopia. Teoksessa Kinnula, Vuokko - Laitinen, Lauri A.- Tukiainen, Pentti (toim.): Keuhkosairaudet. Jyväskylä: Duodecim. 230–242.
- Vibratome: TST Stainer Trio: Päivitetty: 20.2.2007  
<Verkkodokumentti. <http://www.myneurolab.com/global/Manuals/tststainertrio.PDF>>  
Luettu 12.5.2007.
- VWR international 2004: Käyttöturvallisuustiedote, ammoniakkihiuos.
- Whitaker, Darrel- Williams Vincent 1994: Cytopreparatory techniques. Teoksessa Woods, Anthony E. – Ellis, Roy C (toim.): Laboratory Histopathology- A Complete Reference. New York: Churchill Livingstone. 10.1–1–26.
- Wittekind, D. 2003: Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain. Teoksessa Nettleton, G.S (toim.): Biotechnic Histochemistry. Vol. 78(5). Louisville, Kentucky: Taylor&Francis. 261–270.

<b>Step nro.</b>	<b>Reagenssi</b>	<b>Aika</b>
1	70% etanoli	start
2	50% etanoli	00:15
3	aqua	00:15
4	Gill II	00:20
5	juokseva vesi	04:00
6	juokseva vesi	04:00
7	70% etanoli	00:15
8	80% etanoli	00:15
9	96% etanoli	00:15
10	OG	00:30
11	96% etanoli	00:15
12	96% etanoli	00:15
13	EA	01:30
14	96% etanoli	00:15
15	96% etanoli	00:15
16	abs. etanoli	00:15
17	ksyleeni	stop

Näyttemateriaalin valinta ja lasien valmistus.



		TULOS & KEHITYSIDEAT
A	Aloitushjelma: <b>Gill 2 min, OG 30 sek, EA 2 min</b> , juokseva vesi 3 min, alkoholihuuhtelut 15 sek.	Tumat liian tummat.
B	<b>Gill 1 min.</b>	Tumat hieman liian vaaleat.
C	<b>Gill 1.30 min.</b>	Alun nousevan alkoholisarjan tehostus takoituksena PEG:in tehokas poisto.
D	96% etanoli 10 min, 70% etanoli 5 min, 50% etanoli 2min.	Solut värjäytyvät harmahtaviksi, tumat ok.
E	<b>OG 1 min.</b>	Solut värjäytyvät paremmin: kirkkaampia ja turkooseja sävyjä.
F	<b>OG 2 min.</b>	Yleiskuva edelleen harmahtava. EA:n vaihto ja ajan pidennys.
G	<b>EA 2.30 min.</b>	Yleiskuva edelleen harmahtava. Kokeillaan differentaatiota.
H	HCL-diffi 2 sek. ( <b>Gill 1.30 min</b> )	Värjäystulos hieman liian vaalea.
I	HCL-diffi 2 sek, <b>Gill 2 min.</b>	Alkoholihuuhtelut ovat muissa laboratorioissa pidemmät. Kokeillaan pidempiä aikoja. Punasolut menettivät väriä.
J	Välialkoholihuuhtelut 2 min.	Punasolut värjäytyvät paremmin.
K	Välialkoholihuuhtelut 1 min.	Sytoplasmojen värjäytyminen parempi, siisti yleiskuva.
L	<b>OG:n ja EA:n</b> välissä olevat alkoholit 1 min (muut alkoholit 2 min)	Lasit menettivät soluja. Levyepiteelit liian hailakat.
M	Juoksevat vedet 4 min.	Hieman hailakka. Onko differentaatio tarpeen?
N	<b>Scott's Tap Water 30 sek</b> , aqua 2 min (kokonaan uusi malja), juoksevat vedet 3 min.	Melko napakka värjäystulos, hyvä.
O	<b>Scott's Tap Water 1 min</b> , <u>ei HCL-differentaatiota</u>	



Patologi Marketta Riihelä ja esitarkastaja Pirjo Nuorluoto arvioivat G-,H-,I-,J-,K-,L-,N- ja O-värjäykset. Lisäksi kaksi esitarkastajaa ja kaksi patologia arvioivat värjäykset L, N ja O.

LASI NRO. \_\_\_\_\_

Patologi / Esitarkastaja (ympyröi)

Arvioi lasi oheisen asteikon avulla:

4 = Hyvä värjäys

3 = Hyvä, mutta ei moitteeton värjäys

2 = Kohtalainen värjäys

1 = Välttävä värjäys

0 = Epäonnistunut värjäys

**TUMA:**

TUMMUUS	0	1	2	3	4
TERÄVYYS	0	1	2	3	4

**SYTOPLASMAN**

VÄRJÄYTYMINEN	0	1	2	3	4
---------------	---	---	---	---	---

**TAUSTAN**

VÄRJÄYTYMINEN	0	1	2	3	4
---------------	---	---	---	---	---

**SOLUMORFOLOGIA**

	0	1	2	3	4
--	---	---	---	---	---

MUUTA KOMMENTOITAVAA \_\_\_\_\_

---



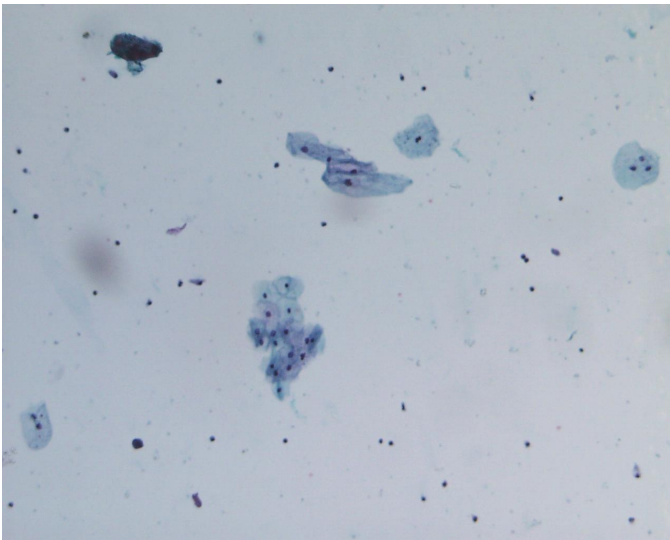
---



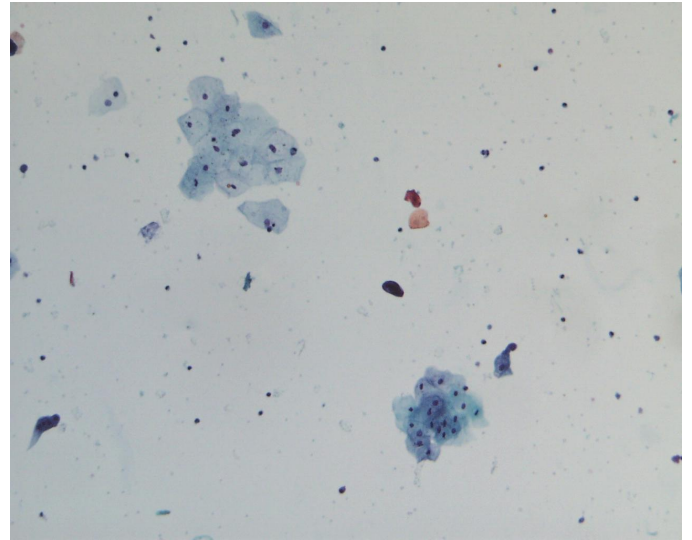
---



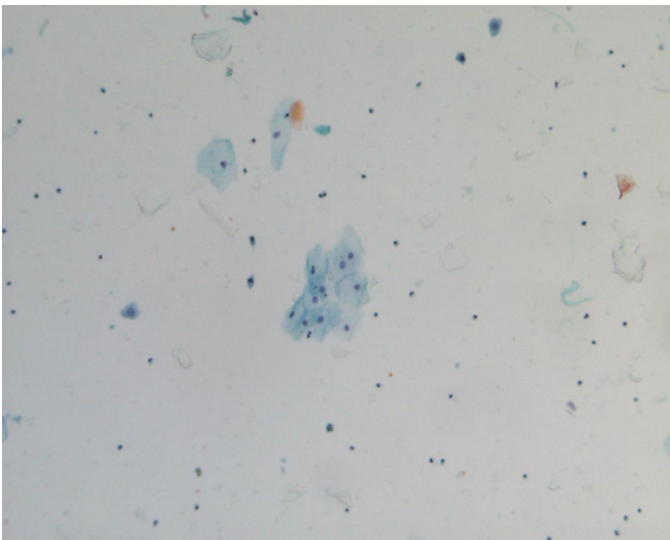
## Mikroskooppikuvia lasisarjasta 101.



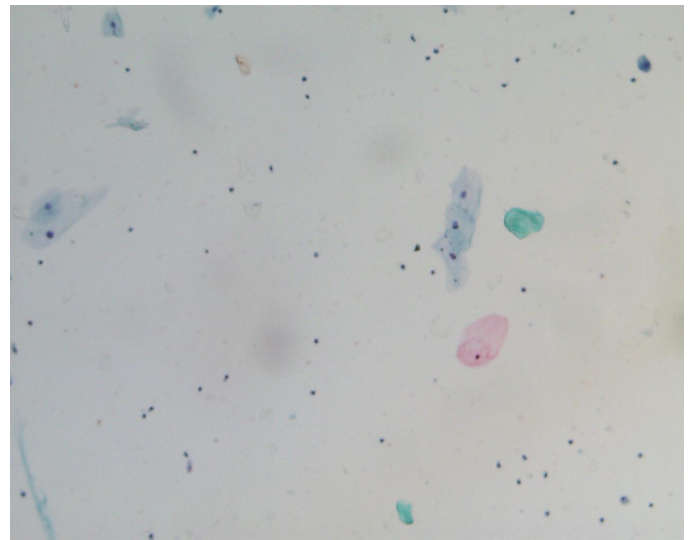
KUVA 1. Lasi 101, värjäys A, suurennos x40



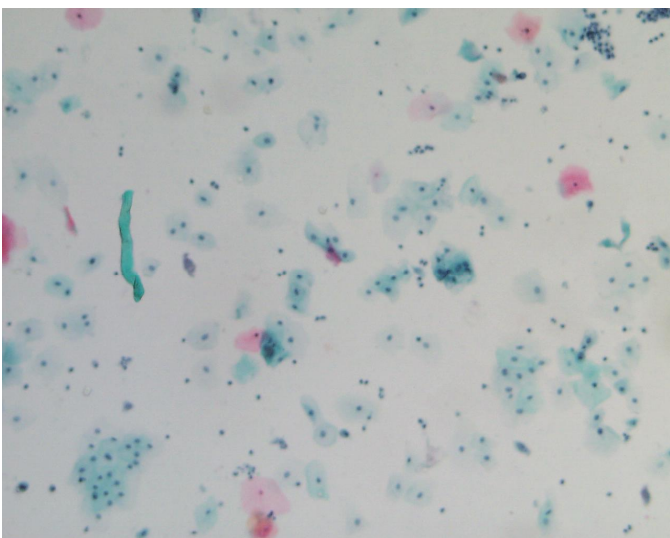
KUVA 2. Lasi 101, värjäys G, suurennos x40



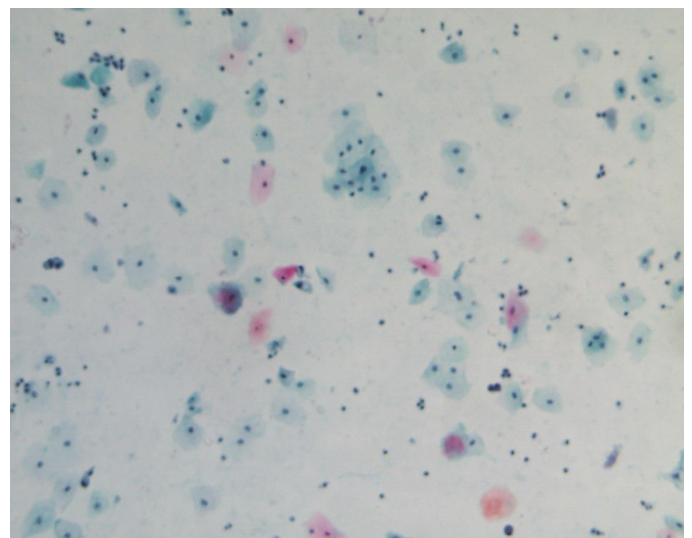
KUVA 3. Lasi 101, värjäys I, suurennos x40



KUVA 4. Lasi 101, värjäys J, suurennos x40

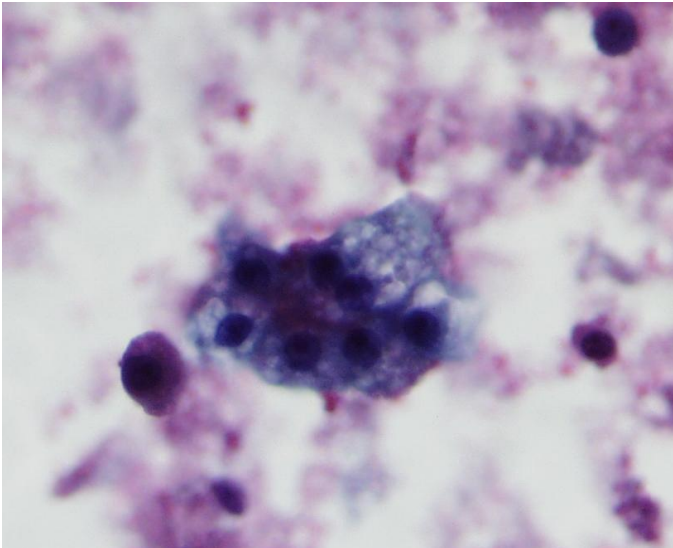


KUVA 5. Lasi 104, värjäys N, suurennos x40

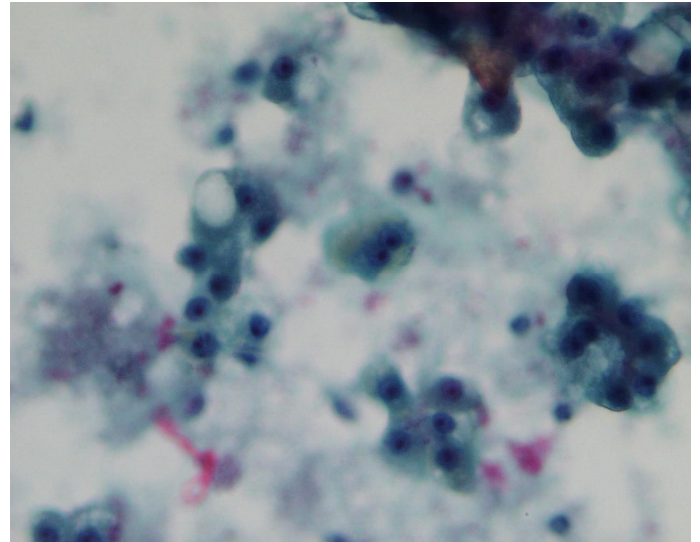


KUVA 6. Lasi 104, värjäys O, suurennos x40

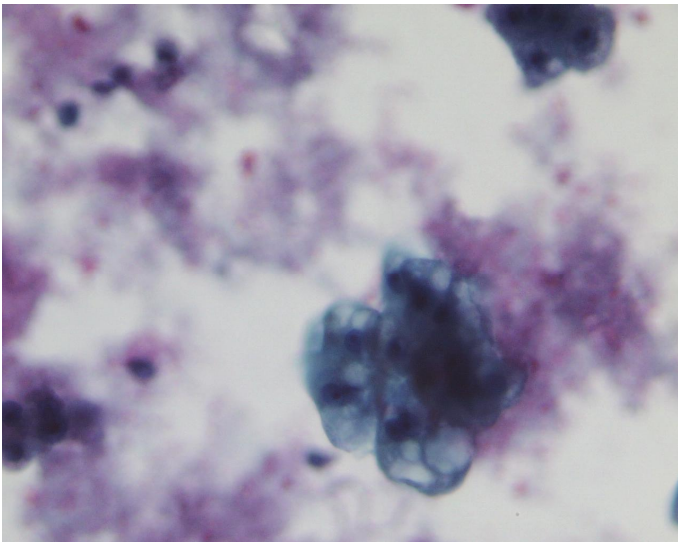
Mikroskooppikuvia lasisarjasta 202.



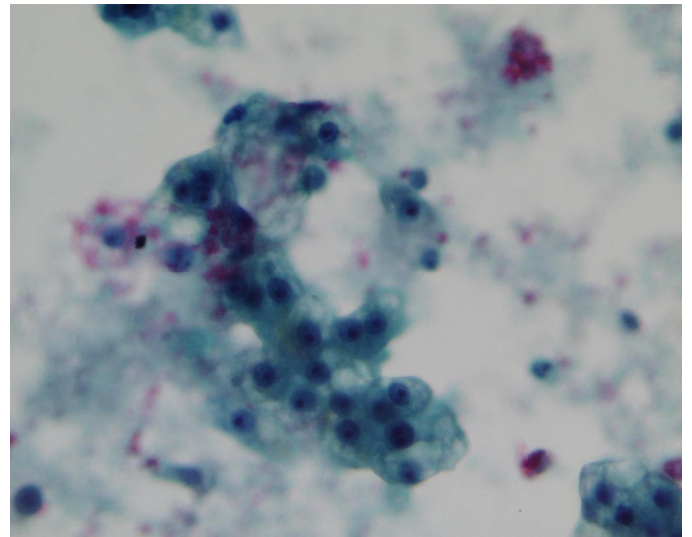
KUVA 1. Lasi 202, värjäys A, suurennos x40.  
Kuvaa on rajattu uudelleen.



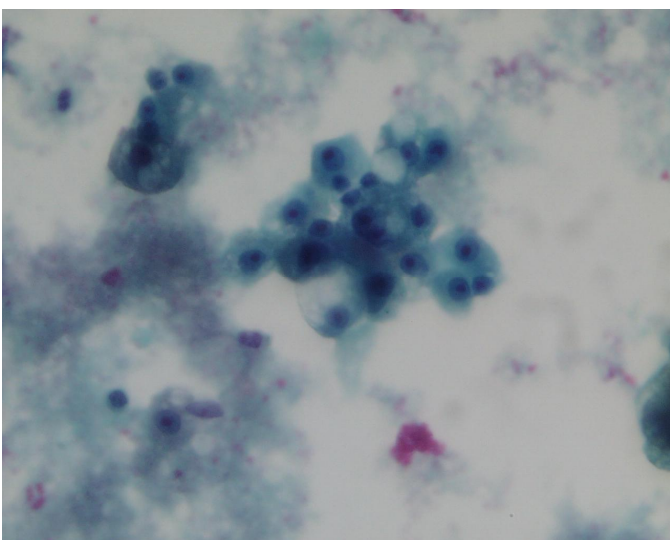
KUVA 2. Lasi 202, värjäys G, suurennos x40



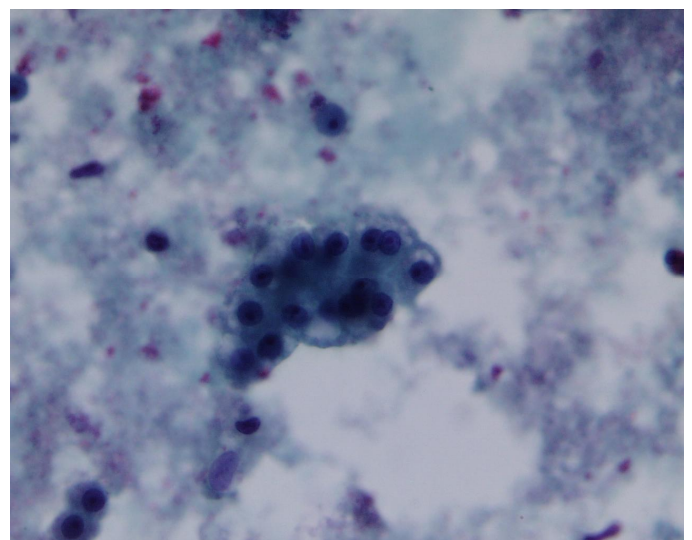
KUVA 3. Lasi 202, värjäys I, suurennos x40



KUVA 4. Lasi 202, värjäys J, suurennos x40



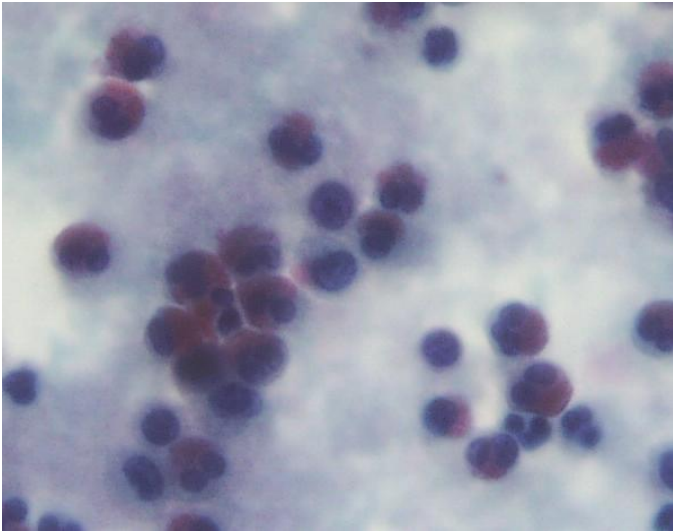
KUVA 5. Lasi 202, värjäys N, suurennos x40



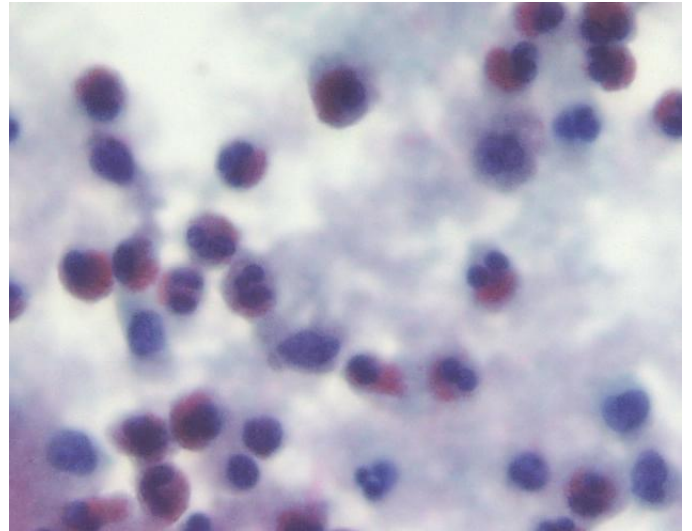
KUVA 6. Lasi 202, värjäys O, suurennos x40



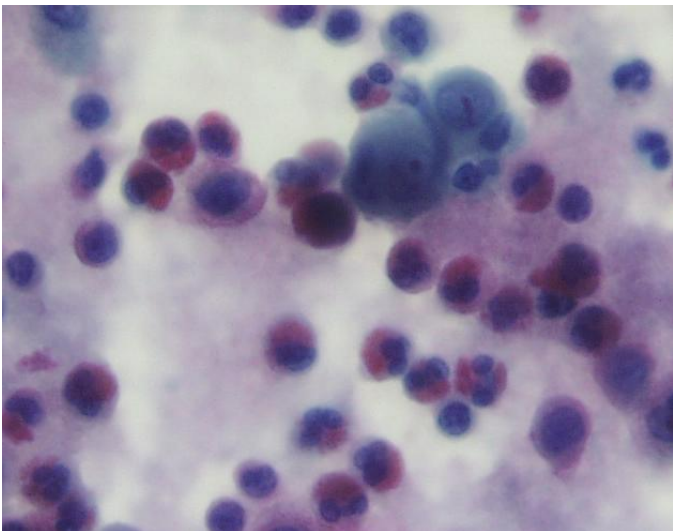
Mikroskooppikuvia lasisarjasta 302.



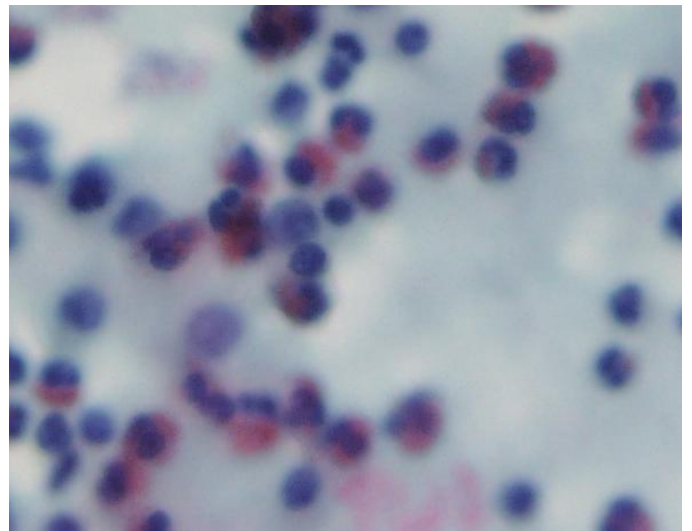
KUVA 1. Lasi 302, värjäys A.



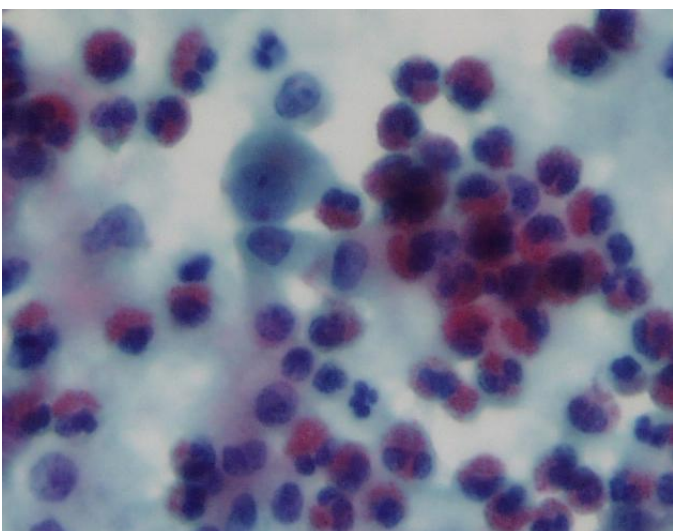
KUVA 2. Lasi 302, värjäys G.



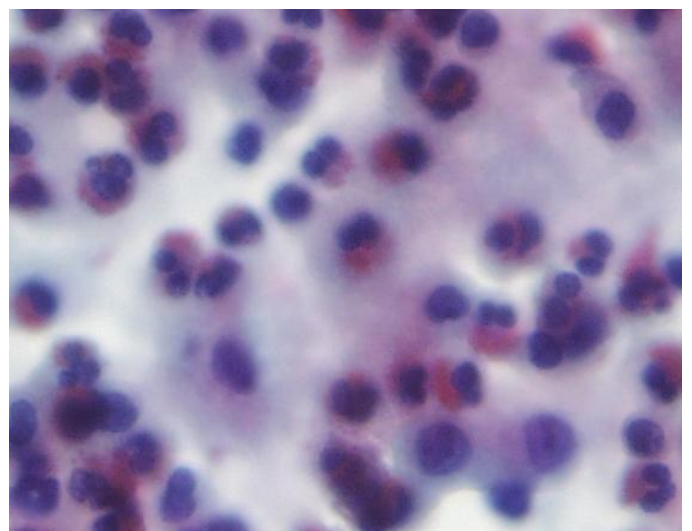
KUVA 3. Lasi 302, värjäys I.



KUVA 4. Lasi 302, värjäys J.

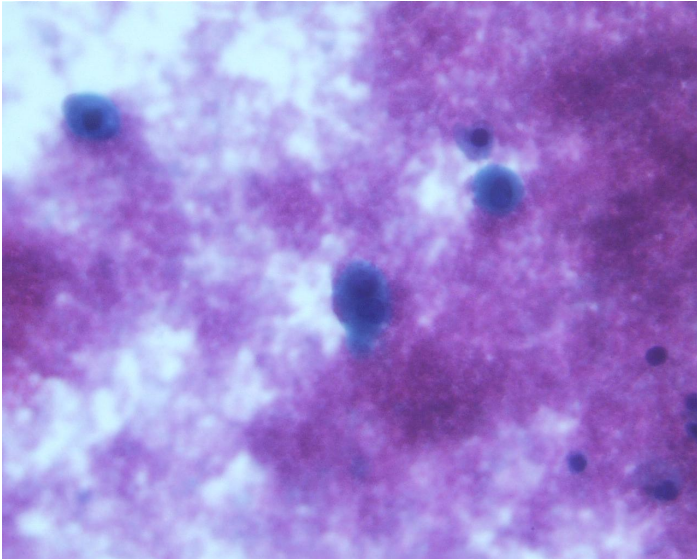


KUVA 5. Lasi 302, värjäys N.

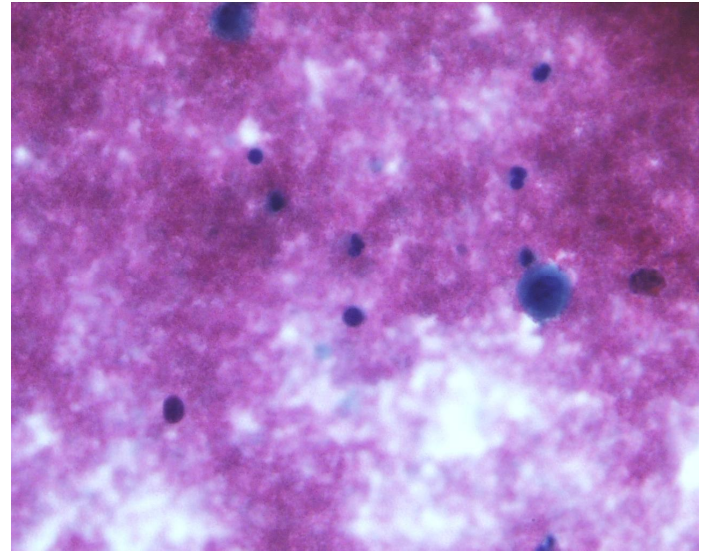


KUVA 6. Lasi 302, värjäys O.

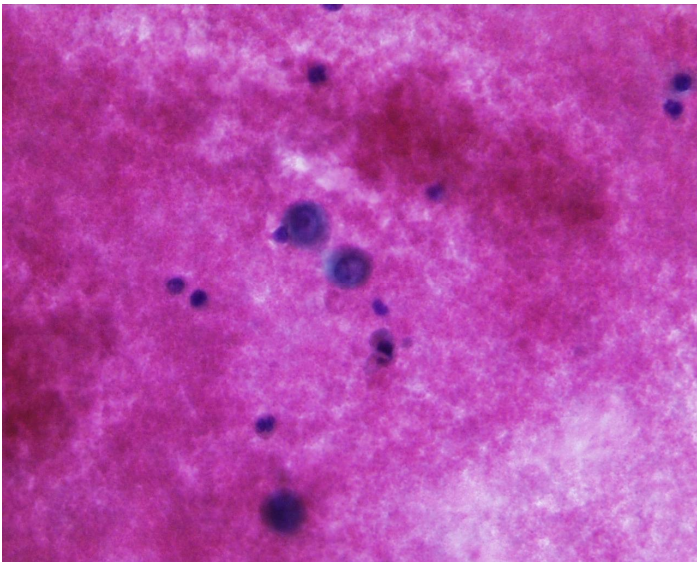




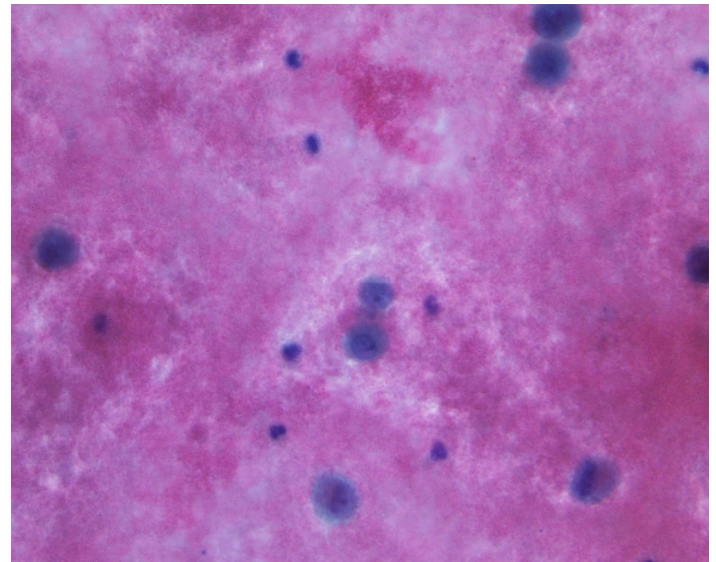
KUVA 1. Lasi 303, värjäys A, suurennos x40.



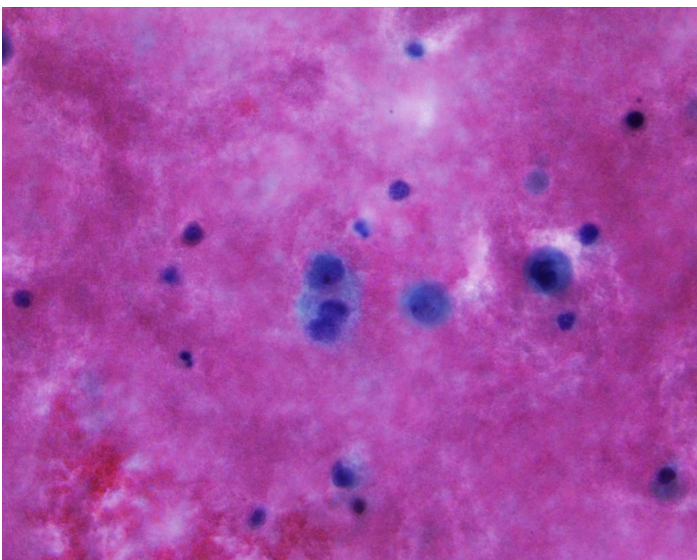
KUVA 2. Lasi 303, värjäys G, suurennos x40.



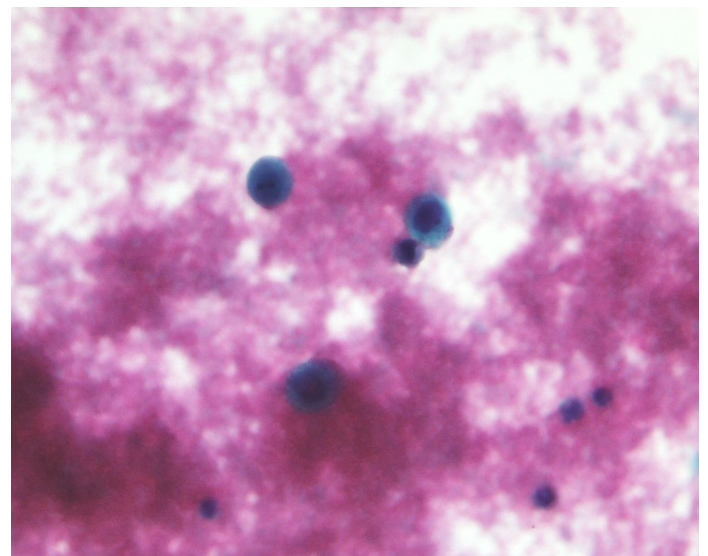
KUVA 3. Lasi 303, värjäys I, suurennos x40.



KUVA 4. Lasi 303, värjäys J, suurennos x40.

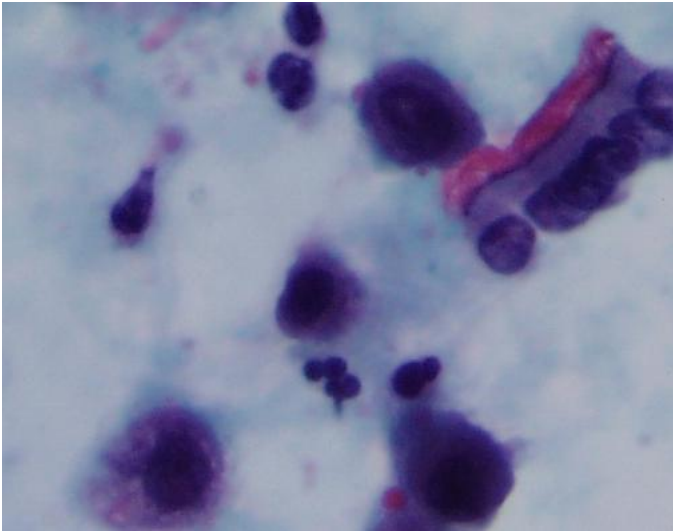


KUVA 5. Lasi 303, värjäys N, suurennos x40.

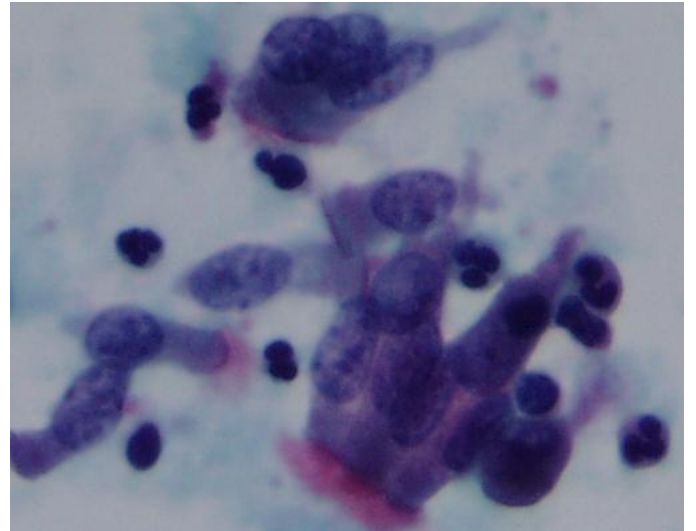


KUVA 6. Lasi 303, värjäys O, suurennos x40.

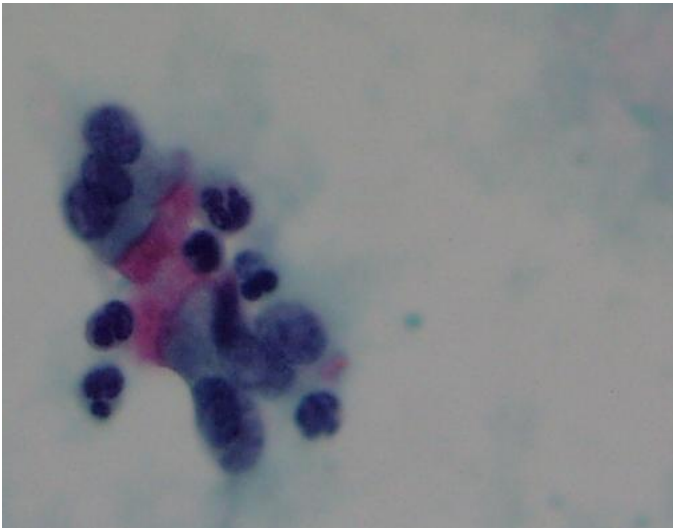




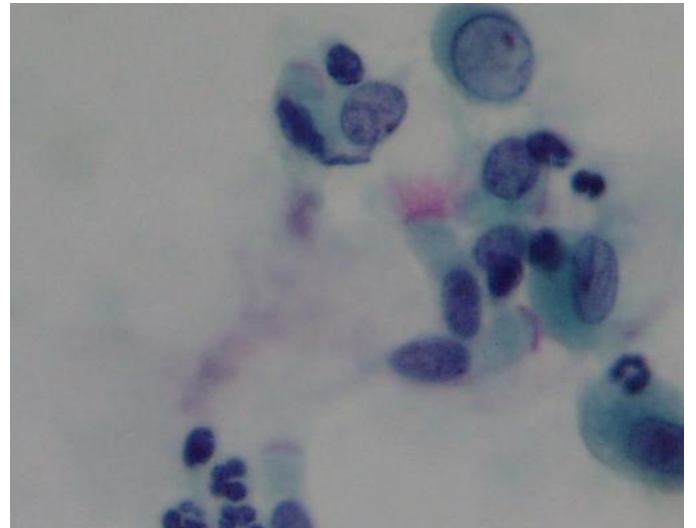
KUVA 1. Lasi 403, värjäys A, suurennos x40.



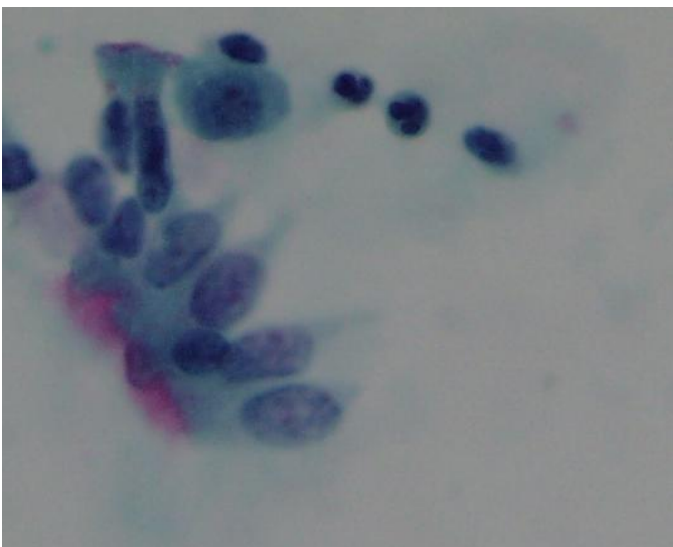
KUVA 2. Lasi 403, värjäys G, suurennos x40.



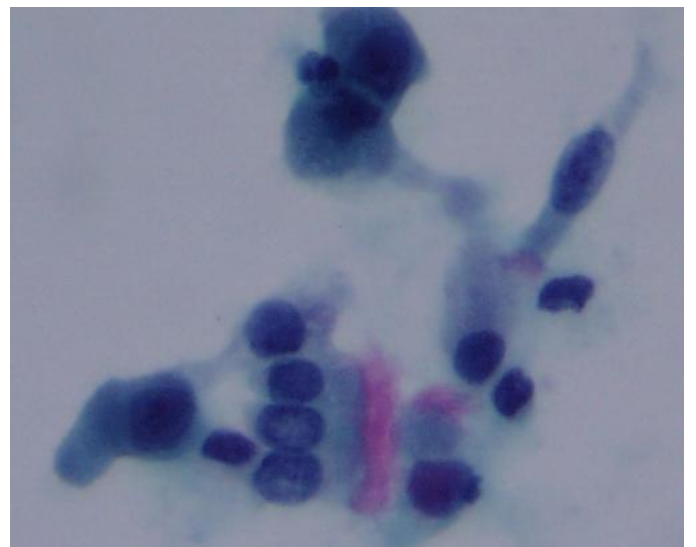
KUVA 3. Lasi 403, värjäys I, suurennos x40.



KUVA 4. Lasi 403, värjäys J, suurennos x40.



KUVA 5. Lasi 403, värjäys N, suurennos x40.



KUVA 6. Lasi 403, värjäys O, suurennos x40.

Taulukossa on esitetty kaikki tulokset.

Värjäykset ja näytteet:		Tuman tummuus	Tuman terävyys	Sytoplasmän värj.	Tausta	Solun morfologia	
Gvärjäys	Näyte:	Virtsa	2,00	2,50	2,50	2,50	2,00
		Maksa ONB	2,50	3,00	2,50	2,50	2,50
		Pleura1	3,00	3,25	2,75	1,75	3,00
		Pleura2	2,50	3,00	3,00	3,00	2,50
		Bronkus	2,00	2,75	2,25	2,00	2,25
Hvärjäys	Näyte:	Virtsa	3,00	2,50	3,00	3,00	2,75
		Maksa ONB	2,75	3,00	3,00	2,50	2,75
		Pleura1	3,50	3,50	3,25	3,00	3,50
		Pleura2	3,00	3,50	3,25	3,00	3,25
		Bronkus	3,00	3,00	2,50	2,25	2,50
Ivärjäys	Näyte:	Virtsa	3,00	2,50	3,00	3,00	2,75
		Maksa ONB	2,75	3,00	2,75	2,50	2,75
		Pleura1	3,50	3,50	3,50	3,00	3,50
		Pleura2	2,50	3,50	2,75	3,00	2,75
		Bronkus	2,50	3,00	2,50	2,25	2,50
Jvärjäys	Näyte:	Virtsa	2,75	3,08	2,67	3,33	2,83
		Maksa ONB	3,00	3,33	3,00	2,33	3,42
		Pleura1	3,58	3,08	3,75	2,83	3,42
		Pleura2	3,08	3,25	3,17	2,33	3,42
		Bronkus	3,33	3,25	3,00	3,33	3,50
Kvärjäys	Näyte:	Virtsa	2,50	2,50	3,00	3,00	2,75
		Maksa ONB	2,50	3,25	2,50	2,50	2,75
		Pleura1	3,50	3,50	3,25	2,50	3,50
		Pleura2	3,00	3,50	3,50	3,50	3,00
		Bronkus	3,50	3,00	2,50	2,00	3,00
Lvärjäys	Näyte:	Virtsa	2,50	3,00	2,75	3,00	2,50
		Maksa ONB	3,00	3,75	3,50	2,50	3,00
		Pleura1	3,00	3,50	3,75	3,00	3,50
		Pleura2	3,00	3,50	3,50	3,00	3,50
		Bronkus	3,50	3,50	3,00	2,50	3,50
Mvärjäys	Näyte:	Virtsa	3,00	3,00	2,50	3,00	3,00
		Maksa ONB	3,00	3,50	3,00	2,50	3,00
		Pleura1	3,50	3,50	3,75	3,00	3,50
		Pleura2	3,50	3,00	3,50	3,00	3,50
		Bronkus	3,50	3,25	3,00	2,50	3,25
Nvärjäys	Näyte:	Virtsa	3,00	2,50	2,67	3,33	2,67
		Maksa ONB	3,08	3,17	2,83	2,50	3,42
		Pleura1	3,50	3,33	3,75	2,83	3,50
		Pleura2	3,33	3,25	2,83	2,33	3,42
		Bronkus	3,08	2,83	3,00	3,00	3,08
Ovärjäys	Näyte:	Virtsa	3,67	3,75	3,67	3,00	3,75
		Maksa ONB	3,25	3,67	3,67	2,83	3,75
		Pleura1	3,42	3,58	3,92	2,67	3,83
		Pleura2	2,33	2,58	2,83	2,50	3,00
		Bronkus	3,33	3,58	3,50	3,17	3,58

Step nro.	Reagenssi	Aika	Alkuperäisen ohjelman ajat
1	96% etanoli	10:00	-
2	70% etanoli	05:00	start
3	50% etanoli	02:00	00:15
4	aqua	00:15	00:15
5	Gill II	02:00	00:20
6	juokseva vesi	03:00	04:00
7	juokseva vesi	03:00	04:00
8	Scott's Tap Water	01:00	-
9	aqua	02:00	-
10	70% etanoli	02:00	00:15
11	80% etanoli	02:00	00:15
12	96% etanoli	02:00	00:15
13	OG	02:00	00:30
14	96% etanoli	02:00	00:15
15	96% etanoli	02:00	00:15
16	EA	02:30	01:30
17	96% etanoli	02:00	00:15
18	96% etanoli	02:00	00:15
19	abs. etanoli	02:00	00:15
20	ksyleeni	stop	stop

