



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Otto Laukkanen

Kokoveren pyruvaatti -määrityksen näyt- teiden säilyvyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalyttikon tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

17.04.2020

Tekijä(t) Otsikko	Otto Laukkanen Kokoveren pyruvaatti -määrityksen näytteiden säilyvyys
Sivumäärä Aika	31 sivua + 0 liitettä 17.04.2020
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalyttikon tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Jaana Anttila Kemisti Sirpa Ranta
<p>Pyruvaatti on kehon aineenvaihdunnassa esiintyvä välituote, josta rakentuu eri prosessien kautta useita solujen toiminnassa tarvittavia proteiineja ja entsyymejä. Sillä on myös tärkeä rooli glukoosin muuntamisessa kehon hyödynnettäväksi energiamuodoksi aerobisen ja anaerobisen glykolyysin kautta.</p> <p>Pyruvaatin määritystä verestä käytetään, kun halutaan tutkia erilaisia aineenvaihduntasairauksia ja kudosten hapensaannin puutoksia. Se ei yksittäisenä tutkimuksena ole diagnostisesti hyödyllinen, mutta sen ja laktaatin suhteella voidaan arvioida laktaattiasidoosin mahdollisuutta ja suuruutta. Pääasiallinen kohderyhmä tutkimukselle on nuoret ja vastasyntyneet lapset, joilta näitä vakavia aineenvaihduntasairauksia halutaan etsiä. Pyruvaattipitoisuutta määritetään Suomessa pääasiassa entsyymaattisella menetelmällä, jossa käytettävä näyte on proteiinisaostettua kokoverta. Tämän näytemateriaalin pidemmän aikavälin säilyvyydestä pakastinlämpötilassa on niukasti tutkimustietoa ja sen ymmärtäminen auttaisi parantamaan tulosten luotettavuutta ja analysoinnin suunnittelua.</p> <p>Tutkimus suoritettiin käyttämällä HUSLAB erikoiskemian laboratorion muista tutkimuksista ylijääneitä verinäytteitä näytemateriaalina. Niistä muodostettiin kahdeksan eri näyte-erää, jotka esikäsiteltiin ja niiden pitoisuuksia ja pitoisuuden muutoksia tutkittiin kuukauden ajan. Jokaisesta näyte-erästä tehtiin myös kaksi erillistä erää, joiden pyruvaattipitoisuutta nostettiin keinotekoisesti, jotta saatiin laajempi skaala eri pyruvaattipitoisuuksia. Tulokset taulukoitiin ja niitä analysoitiin statistisin menetelmin. Tutkimuksen tulosten luotettavuutta arvioitiin sarjojen välisen vaihtuvuuden määrittämisellä, joka perustui kontrollien pitoisuuksien mittamiseen. Lisäksi arvioitiin analyysisarjojen sisäistä vaihtelua Dahlbergin menetelmällä.</p> <p>Tutkimuksessa havaittiin, että säilyvyys on analyysimenetelmän statistisen hajonnan sisällä aina noin 1,5 viikon ajan, jonka jälkeen pitoisuudet alkavat laskea. Pitoisuuksien laskun kliinisen merkittävyyden raja alkoi tämän tutkimuksen perusteella muodostua kolmen ja neljän viikon välillä. Tutkimuksesta saadun tiedon perusteella pystytään nyt muodostamaan parempi kuva pyruvaattinäytteiden säilyvyydestä ja voidaan tarkentaa olemassa olevaa tutkimuksen ohjeistusta.</p>	
Avainsanat	pyruvaatti, säilyvyys, entsyymaattinen, aineenvaihdunta, kliininen merkittävyys

Author(s) Title	Otto Laukkanen Stability of pyruvate samples made from whole blood
Number of Pages Date	31 pages + 0 appendices 17 April 2020
Degree	Biomedical Laboratory Scientist
Degree Programme	Biomedical Laboratory Scientist
Specialisation option	Biomedical laboratory science
Instructor(s)	Senior Lecturer Jaana Anttila Chemist Sirpa Ranta
<p>Pyruvate is a metabolic intermediate product that is transformed through varying processes to become different enzymes and proteins that cells need to function. It also has a critical role in the process where glucose is converted to ATP through aerobic and anaerobic glycolysis.</p> <p>The determination of pyruvate in whole blood is used, when different metabolic disorders and tissue oxygenation deficiencies are studied. It is not diagnostically useful as a single test, but it is used in conjunction with lactate determination to get a lactate:pyruvate ratio that can then be used to determine the level and severity of lactate acidosis. The main target group for the test ranges from infants to young children who are the primary suspect group for these severe metabolic disorders. Pyruvate levels in blood are analyzed mainly through enzymatic methods in Finland and the samples used for the test are denatured whole blood. The long-term stability of these samples in freezer storage have been studied very little, and better understanding of the stability would allow for the improvement of planning the analyses and better reliability for the results.</p> <p>The study was carried out by using excess blood from different whole blood samples in the HUSLAB clinical chemistry laboratory. Eight different sample pools were made that were prepared in a similar way to the actual pyruvate test samples and the pyruvate levels of these samples were determined at set intervals over the course of one month. Two separate sample pools were prepared from each of the eight primary ones and those had their pyruvate levels artificially increased to have a wider range of pyruvate levels in the sample material. The results were collected in charts and analyzed through statistical methods. The reliability of the results was determined by the interassay coefficient of variability by analyzing the results from all the control samples. The Dahlberg method was used to determine the intra-assay coefficient of variability.</p> <p>The results show that the stability was within statistical distribution for the used method for approximately 1,5 weeks, after which a drop was noticed in the pyruvate concentration. The limit for clinical significance was reached after three to four weeks of storage. Based the results of this study there is now a better understanding of the stability of pyruvate test samples in freezer storage and the existing instructions for the test can be improved.</p>	
Keywords	pyruvate, storage stability, enzymatic, metabolism, clinical significance

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Pyruvaatti ja aineenvaihdunta	1
2.1	Pyruvaatti	1
2.2	Laktaatti-pyruvaatti -suhde	5
2.3	Aineenvaihduntasairaudet	5
2.3.1	Pyruvaattikarboksylaasi	6
2.3.2	Pyruvaattidehydrogenaasi	6
3	Pyruvaatin analyysimenetelmä	7
4	Toteutus	8
4.1	Alkutestaus ja näytemateriaali	10
4.2	Näytteiden esikäsittely	10
4.3	Analyysi	11
5	Tulokset	12
5.1	Laadunarviointi	12
5.2	Pyruvaatin säilyvyys näytteissä ilman lisäyksiä	14
5.3	Pyruvaatin säilyvyys näytteissä, joihin on lisätty pyruvaattia	17
6	Tulosten tarkastelu	19
6.1	Tulosten luotettavuuden arviointi	19
6.2	Tulosten käytettävyyden arviointi	21
7	Pohdinta	22
8	Tutkimuseettiset näkökohdat	24
9	Lähteet	25

1 Johdanto

Pyruvaatti on keskeinen metabolinen tuote ja lähtöaine solun eri prosesseissa liittyen pääasiassa energiantuotantoon prosesseille ja sen hyödyntämiseen. Sen pitoisuuden määrittämisellä pyritään tarkentamaan diagnooseja metabolisten tautien epäilyissä ja kudosten hapensaannin heikentymisissä. (Ranta 2019.)

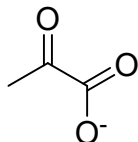
Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää mahdolliset pyruvaattipitoisuuden muutokset, joita voi tapahtua perkloorihappokäsitellyn ja sentrifugoidun pyruvaattinäytteen säilytyksen aikana pakastinlämpötilassa (-20°C). HUSLABin toimipisteissä otetut, käsitellyt ja pakastetut näytteet odottavat analysointia keskimäärin viikon verran, mutta ulkopuolelta tulevat näytteet voivat olla säilytyksessä pidempään riippuen niiden näytteenottoajasta ja saapumisesta näytteiden vastaanottoon.

Tutkimuksella haluttiin varmistua pakkasessa säilytettyjen näytteiden todellisesta säilyvyydestä kuukauden sisällä ja nähdä, laskevatko pitoisuudet erityisesti korkeilla pyruvaattipitoisuuksilla merkittävässä määrin. Huomiota kiinnitettiin lähellä viitearvoaluetta, mutta kuitenkin sen yläpuolella oleviin alkupitoisuuksiin ja niiden mahdollisiin muutoksiin. Lisäksi arvioitiin kliinisen merkittävyyden rajaa ja sen perusteella säilytyksen tulevaa ohjeistusta.

Opinnäytetyö toteutettiin HUS Diagnostiikkakeskuksen, HUSLABin kliinisen kemian vastualueella, erikoiskemian laboratoriossa. Erikoiskemian laboratoriossa tutkimusta ohjasi kemisti Sirpa Ranta.

2 Pyruvaatti ja aineenvaihdunta

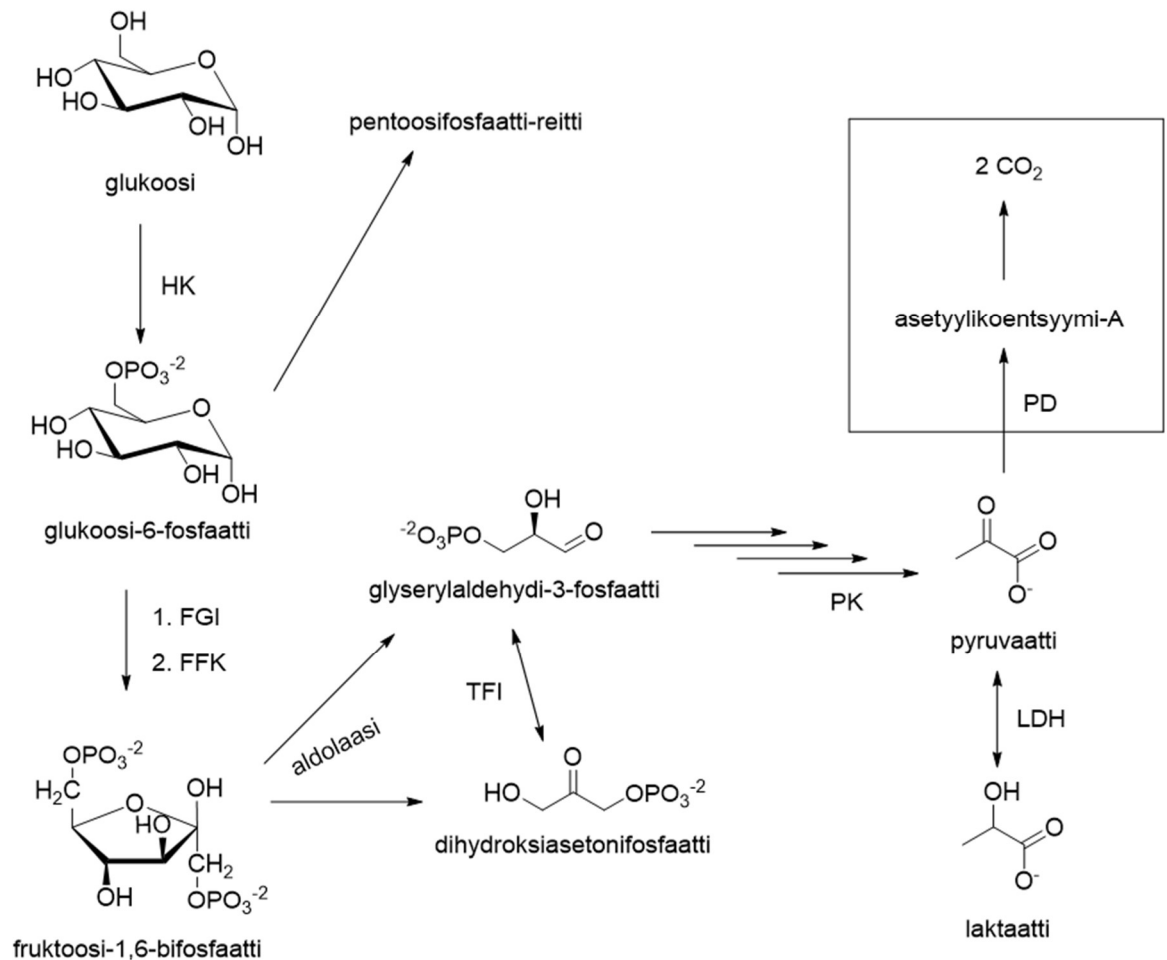
2.1 Pyruvaatti



Lähestulkoon kaikkien eri elollisten organismien metaboliset reaktiot tapahtuvat suurimmilta osin samojen mekanismien kautta. Suurimmat eroavaisuudet johtuvat

erilaisista energianlähteistä. Aerobiset eliöt kuten ihminen, käyttävät happea ravintoaineiden hapetukseen ja sitä kautta energiantuottoon. Energianlähteenä voi toimia rasvat, proteiinit tai hiilihydraatit. Solutasolla tapahtuvaan soluhengitykseen tarvitaan kuitenkin glukoosia, jota keho joko pilkkoo ravinnosta tai valmistaa itse tarpeidensa mukaan. Kun glukoosi on saatu kuljetettua soluun, sitä muokataan erilaisten entsyymikatalysoitujen fosforylaatioreaktioiden, isomerisaatioiden sekä dehydraatioiden kautta siten, että lopputuotteena saadaan pyruvaattia tai hapettomissa olosuhteissa laktaattia. Tätä kutsutaan glykolyysiksi. Aerobisessa glykolyysissä syntyy myös nettona kaksi ATP (adenosiinitrifosfaatti) molekyyliä ja kaksi NADH (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi) molekyyliä, joten glykolyysi toimii jo itsessään energiantuotantoreaktiona. (Voet – Voet – Pratt 1999.)

Pyruvaatti on palorypälehapon eli 2-oksopropanihapon konjugaattiemäs. Sitä esiintyy käytännössä kaikkien elävien organismien solujen energia-aineenvaihdunnassa ja metabolisissa prosesseissa. Pyruvaatista solu voi valmistaa esimerkiksi rasvahappoja energian varastointia varten, kolesterolia hormonisynteesien tarvetta varten tai aminohappoja käytettäväksi proteiinisynteesiin. Pyruvaatti on myös mitokondrioissa tapahtuvan sitruunahappokierron lähtöaine. Se on hyötysuhteeltaan glykolyysiä huomattavasti tehokkaampi energiantuotantoketju, mutta se on hitaampi. (Litwack 2018.)



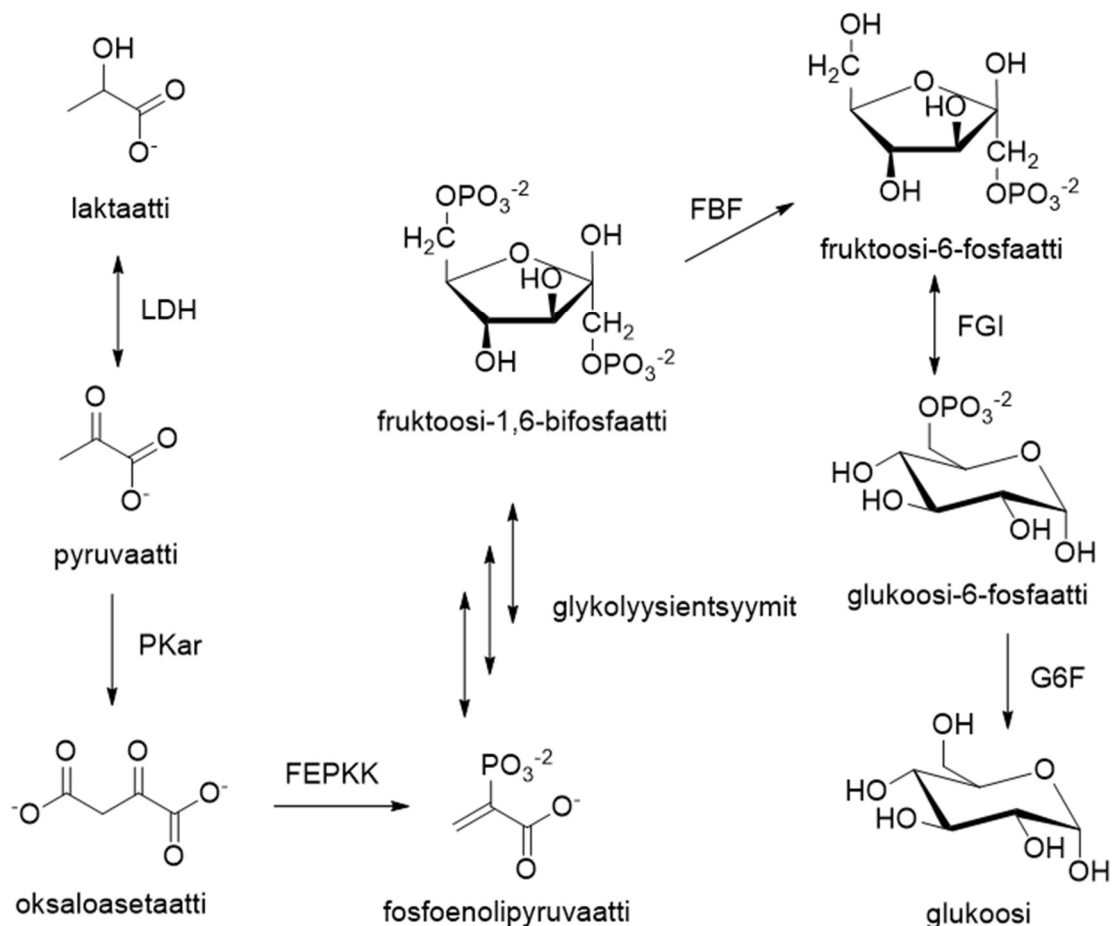
Kuvio 1. Glykolyysi. LDH, laktaattidehydrogenaasi; HK, heksokinaasi; FGI, fosfogluukoosi-isomeraasi; FFK, fosfofruktokinaasi; TFI, trioosi fosfaatti isomeraasi; PK, pyruvaattikinaasi; PD, pyruvaattidehydrogenaasi. (Litwack 2018. tekstin pohjalta O.L.).

Glykolyysin päävaiheet on esitelty kuviossa 1, jossa glukoosi muunnetaan pyruvaatiksi. Aerobisissa olosuhteissa, siirryttyään mitokondrioon, pyruvaatti hapettuu täysin hiilidioksidiksi ja vedeksi sitruunahappokierron kautta. Anaerobisessa glykolyysissä, jota tapahtuu hapettomissa olosuhteissa, pyruvaatti muuttuu edelleen laktaatiksi eli 2-hydroksipropanihapon konjugaattiemäkseksi. Tätä pelkistymisreaktiota katalysoi laktaattidehydrogenaasi. Hiivoilla tämä fermentaatioprosessi johtaa etyylialkoholin muodostumiseen. (Voet ym. 1999.)

Solut, jotka eivät sisällä mitokondrioita, kuten punasolut, saavat energiansa yksinomaan anaerobisella glykolyysillä (Van Wijk – van Soling 2005). Siinä syntyy yhdestä glukoosimolekyylistä kaksi laktaattimolekyyliä ja kaksi ATP-molekyyliä. Laktaatti siirtyy verenkierron mukana maksaan, jossa se toimii glukoneogeneesin raaka-aineena.

Laktaatinmuodostuksen yhteydessä vapautuu vastaava määrä protoneita, jotka johtavat happamoitumiseen, jos keho ei pysty korjaamaan pH muutosta. (Litwack 2018.)

Glukoosia voidaan tarvittaessa vapauttaa myös glykokeenistä, joka on maksan tuottama glukoosivarasto. Glykokeeni on reilun sadan tuhannen glukoosimolekyylin muodostama hyvin haaroittunut polymeeri. Tätä glykokeenivarastoa riittää kuitenkin vain noin puolen päivän tarpeisiin aivojen energiansaannin turvaamiseksi. Verenkierron noin 5 mM glukoositasapainon säilyttämiseksi ja glukoosin tuottamiseksi anaerobiseen energiantuottoon, vastareaktio glykolyysille on glukoneogeneesi. Tässä reaktiossa (kuvio 2) laktaatti tai suoraan pyruvaatti muunnetaan glukoosiksi. Oksaloasetaatin synteesi pyruvaatista tapahtuu mitokondrioissa tai vaihtoehtoisesti se kuljetetaan malaatti-aspartaatti-järjestelmän avulla sytoplasmaan. (Litwack 2018.)



Kuvio 2. Glukoneogeneesi. LDH, laktaattidehydrogenaasi; PKar, pyruvaattikarboksylaasi; FEPKK, fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasi; FBF, fruktoosibifosfataasi; FGI, fosfoglukoosi-isomeraasi; G6F, glukoosi-6-fosfataasi. (Litwack 2018. tekstin pohjalta O.L.).

Tämä johtaa niin sanottuun Corin sykliin, jossa maksa tuottaa glukoosia laktaatista ja anaerobinen glykolyysi soluissa (lihassolut, punasolut ja suurin osa aivojen hermosolujen energian tuotannosta) tuottaa energiaa ja laktaattia glukoosista. (Vazquez 2018.)

Kun glukoosipitoisuus veressä laskee, alkaa keho käyttämään myös aminohappoja energiantuotantoon transaminaation kautta. Tietyt aminohapot muuntuvat suoraan eri osiksi sitruunahappokiertoa, muttaalaniini ja alfa-ketoglutaarihappo muuntuvat transaminaation kautta pyruvaatiksi ja glutamaatiksi. Tätä reaktiota katalysoialaniiniaminotransferaasi (ALAT). (Litwack 2018.)

2.2 Laktaatti-pyruvaatti -suhde

Laktaatti-pyruvaatti -suhteella viitataan laktaatin ja pyruvaatin pitoisuuksien väliseen suhteeseen veressä. Tähän suhteeseen vaikuttaa tärkeimpänä laktaattidehydrogenaasientsyymi. Soluissa tapahtuva glykolyysi johtaa anaerobisena laktaatin muodostukseen ja sen pitoisuus veressä nousee. Tätä suhdetta käytetään laktaattiasidoosin diagnostiikassa jatkotutkimuksena, kun mitään erityistä syytä kohonneelle laktaattipitoisuudelle ja kehon happamoitumiselle ei löydy. Suhteen tarkastelusta on myös erotusdiagnostista hyötyä lastentautien puolella mitokondrion hengitysketjun toiminnan häiriöiden ja synnynnäisen laktaattiasidoosin välillä. Mitokondrion hengitysketjun häiriöissä laktaatti-pyruvaatti -suhde on usein yli 25. Jos laktaattiarvot ovat kohonneet, mutta suhde on alle 25, syynä voi olla pyruvaatin metaboliaan liittyvät häiriöt. (Feldman ym. 2017; Debray ym. 2007.)

Muita aineenvaihduntaan liittyviä sairauksia, joiden diagnostiikassa laktaatti-pyruvaatti -suhteen määrittämisestä voi olla hyötyä on esimerkiksi orgaanishappovirtsaisuudet, kongenitaaliset hyperammonemiat ja rasvahappo-oksidaation häiriöt. Lisäksi glukoneogeneesin häiriöissä, glukoosi-6-fosfataasin puutteessa ja pyruvaattikarboksylaasin puutteessa esiintyy poikkeuksellisia laktaatti-pyruvaatti -suhteita (TYKSLAB 2016.)

2.3 Aineenvaihduntasairaudet

Aiemmissa kappaleissa tarkasteltujen reaktioketjujen toiminnasta vastaa lähes yksinomaan erilaiset entsyymit, jotka mahdollistavat yhdessä ATP molekyylin energian ja NADH/NAD⁺ hapetusketjun kautta elimistön eri reaktioiden toiminnan. NADH/NAD⁺ pari toimii energiarikkaana elektroninsiirtokoentsyyminä. (Voet ym. 1999.)

Entsyymit ovat tiettyjä biokemiallisia prosesseja varten rakennettuja proteiineja, jotka usein sisältävät eri alkuaineioneja tai pienimolekyylisiä yhdisteitä kofaktoreina. Niiden synteesi on koodattu geeneihin ja sitä kautta niissä voi tapahtua mutaatioita. Nämä muutokset voivat oleellisesti muuttaa niiden toimintaa siten, että jotkut elintärkeät reaktiot eivät enää etene halutulla tavalla. Tällöin voi käydä niin, että substraatin pitoisuus entsyymin reaktioon kasvaa, kun sitä ei hyödynnetä, ja vastaavasti reaktiotuotteen pitoisuus laskee. Tämä voi johtaa myös sekundaarisiin muutoksiin muissa mekanismeissa, jotka hyödyntävät reaktioketjun joitain substraatteja. (Tondo ym. 2015.)

Entsyymipuutoksia tiedetään esiintyvän niin hiilihydraattien ja lipidien kuin aminohappojenkin aineenvaihdunnassa. Jotkin niistä eivät oireile välittömästi, mutta aktivoituvat esimerkiksi flunssan tai ravinnonsaannin muutoksien yhteydessä. (Tondo ym. 2015.) Vaikka seulonnalla pyritään löytämään nopeasti yleisimmät sairaudet, ei kaikkiin ole toimivia hoitokeinoja ja tällöin kyseisiä tauteja ei välttämättä edes ole otettu mukaan seulontaan.

2.3.1 Pyruvaattikarboksylaasi

Pyruvaattikarboksylaasi on mitokondriossa toimiva entsyymi, joka katalysoi oksaloasettiin synteesiä pyruvaatista. Se on siten tärkeässä roolissa glukoneogeneesissä, joka on osa kehon energia-aineenvaihdunnan prosesseja. Pyruvaattikarboksylaasin puutos on hyvin harvinainen tauti, joka johtaa nopeasti syntymän jälkeen vaikeaan laktaattiasidoosiin ja kohonneeseen veren ammoniakkipitoisuuteen. Taudin hoitaminen on nykyisellään vielä hyvin haastavaa ja elinajanodote on alle vuosi. (García-Cazorla ym. 2006.)

2.3.2 Pyruvaattidehydrogenaasi

Pyruvaattidehydrogenaasin puutos on toinen hyvin harvinainen sairaus, joka johtaa sairauden tyypistä riippuen laktaattiasidoosiin ja erilaisiin neurologisiin oireisiin. Tämä mitokondriossa sijaitseva entsyymi katalysoi pyruvaatin muunnosta asetyylikoentsyymi-A:ksi ja on siten tärkeässä osassa sitruunahappokiertoa. Sen puutos ajaa pyruvaattia laktaattiksi, joka johtaa huomattavasti alhaisempaan energiantuottoon ja lisääntyneeseen happamoitumiseen. Puutoksen diagnostiikassa laktaatti-pyruvaatti -suhde on tärkeä. Lisäksi voidaan tutkia plasman ja virtsan aminohappopitoisuuksia. Vaikka ruokavaliota säätelemällä voidaan vaikuttaa asidoosiin ja saada keho tuottamaan asetyylikoentsyymi-A:ta

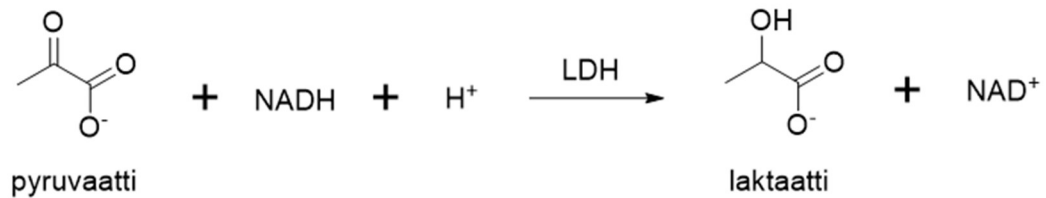
muita reittejä pitkin, on ennuste silti hyvin huono neurologisten oireiden takia. (De Meirleir – Van Coster – Lissens 2006.)

3 Pyruvaatin analyysimenetelmä

Pyruvaatin pitoisuutta veressä tutkitaan nykyään entsyymipohjaisilla menetelmillä. Yksi menetelmistä hyödyntää NADH:n absorption laskun mittausta fotometrisesti reaktiossa, jossa pyruvaatti pelkistetään laktaatiksi laktaattidehydrogenaasilla (Wulkan – Verwers – Neele – Mantel 2001). Toinen menetelmä käyttää pyruvaattioksidaasia näytteessä olevan pyruvaatin hajottamiseksi asetyylifosfaatiksi, vetyperoksidiksi ja hiilidioksidiksi. Muodostunut vetyperoksidi reagoi edelleen ADPH:n (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, 10-asetyyli-3,7-dihydroksifenoksaasiini) kanssa peroksidaasin katalysoimana ja muuttuu fluoresoivaksi resorufiiniksi. Pyruvaattipitoisuus lasketaan tässä menetelmässä standardikäyrän perusteella (Cayman Chemical 2016). Tutkimuksen viitearvoja on esitetty taulukossa yksi.

Näytteenä tässä tutkimuksessa (B-Pyruv, käytetään yleisimmin EDTA-kokoverta (ethyleenediaminetetraacetic acid, etyleenidiamiinitetraetikkahappo, jonka kaliumsuola toimii antikoagulanttina), joka otetaan ilman staasia. Paasto on suositeltu, mutta ei ehdoton. Pyruvaatti on pitoisuudeltaan hyvin epästabiili näissä näytteissä, joten välittömästi näytteenoton jälkeen verta pipetoidaan kahteen jäähauteessa olevaan, perkloorihappoa (8%) sisältävään putkeen, 0,5 ml kumpaankin. Näytteet sekoitetaan voimakkaasti, mieluiten vortex-sekoittajalla, jonka jälkeen supernatantti erotetaan proteiinisakasta kylmäsentrifugoinnilla (10°C/2600g/10min). Näytteiden säilytys tapahtuu pakastamalla, jos niitä ei saada analysoitavaksi tunnin kuluessa. (InstruChemie 2017; Ranta 2019.)

HUSLAB erikoiskemia käyttää pyruvaatin määrittämiseen InstruChiemien valmistamaa kit-tiä. Se perustuu pyruvaatin pelkistämiseen laktaatiksi laktaattidehydrogenaasin avulla (kuvio 3). Reaktiossa NADH toimii elektroninluovuttajana ja hapettuu itse NAD⁺:ksi. NADH:n pitoisuuden lasku reaktion edetessä on suoraan verrannollinen pyruvaatin pitoisuuteen ja se mitataan fotometrisesti aallonpituudella 340 nm. (InstruChemie 2017.)



Kuvio 3. Instruchemie pyruvaatti-kitin reaktio (Instruchemie 2017. pohjalta O.L.).

Testikitin kontrollina käytetään Instruchemien korkean pitoisuuden laktaatti/pyruvaatti-kontrollia, josta laimentamalla saadaan myös matalalle tasolle kontrolli. Kitissä on analyysin vakiointia varten standardiliuos. Ulkopuolista kontrollointia määrittämisen toistettavuuteen tehdään normaalisti kerran kuukaudessa.

Pitoisuuden määrittäminen kittiä käyttäen etenee käytännössä seuraavasti: näytteeseen tai vastaavalla tavalla käsitellyyn kontrolliin lisätään puskuria tietyssä suhteessa. Sekoitetaan ja lisätään NADH-reagenssia. Sekoitetaan ja mitataan absorbanssi. Lisätään LDH-reagenssia, sekoitetaan ja mitataan absorbanssi viiden minuutin kuluttua.

Pyruvaatin pitoisuus $\mu\text{mol/l}$ voidaan laskea absorbanssin muutoksesta, joka suhteutetaan aina samassa sarjassa mitattuun vakioon. Kittivalmistajan tekemän validoinnin perusteella tulokset ovat lineaarisia pitoisuuksilla 5 – 340 $\mu\text{mol/l}$ (CVsis% 3,5).

Taulukko 1. Tutkimuksen viitearvot (Fimlab 2018; Ranta 2019; Rivinoja 2018.).

ORGANISAATIO	VIITEARVO ($\mu\text{mol/l}$)
HUSLAB	40 – 70
FIMLAB	30 – 70
NORDLAB	30 – 80

4 Toteutus

Näytteiden säilyvyyttä suunniteltiin testattavan niin, että saataisiin tarvittavan laajalla skaalalla tutkittua kuukauden kestävästä säilytyksestä pakastimessa viitearvoalueella ja kliinisesti merkittävimmillä yli 70 μM pitoisuuksilla. Näyttemateriaalina päädyttiin käyttämään HUSLABin EDTA-verinäytteitä näytteenoton sijasta. Nämä näytteet ovat ylijääneitä näyt-

teitä muista tutkimuksista ja niitä on säilytetty 4°C:ssa. Tämä palvelee tutkimuksen tarpeita riittävästi, kun ainoa kriteeri on humaaniperäinen EDTA-verinäyte ja näytteiden pyruvaattipitoisuuden lähtötasolla ei ole juurikaan merkitystä.

EDTA-ylijäämäverinäytteitä kerättiin riittävä määrä, jotta saataisiin statistisesti merkittävää tietoa säilyvyydestä (Myers – Well – Lorch 2013). Pyrittiin siis varmistamaan, että mahdolliset muutokset pitoisuuksissa johtuvat näytteiden säilyvyydestä eivätkä joistain muista yksittäisistä muuttujista. Toteutunut näyte-erien määrä oli 8, joista jokaisesta tehtiin yksi erä sellaisenaan ja kaksi erää nostamalla keinotekoisesti näyte-erän pyruvaattipitoisuutta.

Tutkimus aloitettiin yhdistämällä riittävä määrä EDTA-verinäytteitä, jotta saatiin noin 25 ml verta ja jaettiin se kolmeen 7 ml:n osaan. Kahteen osaan lisättiin pyruvaattiliuosta pitoisuuden nostamiseksi. Lisäys tehtiin niin, että laskettu pitoisuuden nousu olisi välillä 50-200 µM. Metabolian vaikutus näihin pyruvaattilisäysten pitoisuuksiin ei ole tiedossa. Kaikki kolme näyte-erää käsiteltiin tämän jälkeen perkloorihapolla ja saadut supernatantit jaettiin osiin, jotka säilytettiin -20°C:ssa. Yhtenäisellä preanalyttisellä menetelmällä varmistettiin, että pakastettavat näyte-erät ovat vertailukelpoisia keskenään. Ensimmäisten näytteiden analysointi tehtiin verinäytteiden perkloorihappokäsittelyä seuraavana päivänä, jolloin saatiin lähtötaso. Seuraavia analyysejä tehtiin 3-4 vuorokauden, 6-7 vuorokauden ja 9-10 vuorokauden jälkeen ja siitä eteenpäin viikoittain aina neljään viikkoon asti.

Analyysit suoritettiin aiemmin kuvatulla menetelmällä, käyttäen Instruchemien kittiä 2897 (manuaalimenetelmä). Käytännössä seurattiin näytteessä tapahtuvaa absorbanssin laskua käyttäen spektrofotometriä. Näytteessä olevan pyruvaatin pitoisuus laskettiin absorbanssin muutoksesta, joka suhteutettiin samassa sarjassa mitattuun vakioon. Kussakin aikapisteessä mitattuja pyruvaattipitoisuuksia verrattiin lähtötasoon. Tuloksista laskettiin aikapisteiden välinen toistuvuus (variaatiokerroin, CV%), jota verrattiin sarjojen väliseen toistuvuuteen (CVväl%), sekä laskettiin ero-% verrattuna lähtötasoon. Menetelmän sisäinen (CVsis%, Dahlbergin menetelmä) ja sarjojen välinen toistuvuus (CVväl%, kontrollinäytteistä) laskettiin tutkimuksen aikaisista analyysisarjoista. Tarkoituksena oli varmistaa menetelmän toistuvuus tutkimusnäytteiden analysoinnin aikana, vaikka Instruchemien kitin menetelmä on validoitu valmistajan toimesta. Saatuja eri aikapisteiden tuloksia pystyttiin myös vertaamaan lähtötasoon laskemalla tilastollinen merkittävyys ja korrelaatio.

4.1 Alkutestaus ja näytemateriaali

Viikon kestäneessä alkuvaiheessa suunniteltiin tutkimuksen käytännön suorittamista työn toteutuksen kannalta. Alkuperäisen suunnitelman näytemääriä, tarvittavia tilavuuksia, analyysikittien määriä, reagenssien tilaamisia ja muita käytännön asioita pohdittiin ja testattiin. Suunnitelma myös muuttui näytemateriaalin osalta näytteenotosta ylijäämäverinäytteiden hyödyntämiseen.

Analyysin suorittamista harjoiteltiin useilla sarjoilla ja sisäistä toistuvuutta testattiin isoilla sarjoilla samaa näytettä.

Kuten aiemmin todettiin, niin tutkimuksessa päädyttiin hyödyntämään erikoiskemian työpisteeseen saapuneiden näytteiden ylijäämäosuuksia. Näytteitä oli säilytetty 4°C jääkaappilämpötilassa, mutta eri näyte-erät ovat eri tutkimuksiin alun perin tarkoitettua näytemateriaalia. Potilaiden tila näytteenottohetkellä on tuntematon. Yhteen näyte-erään otettiin noin 13-15 näyteputken ylijäämä verimäärä. Se oli keskimäärin 25 ml, kun yhteen tutkimuksen näyte-erään tarvittiin vähintään 21 ml EDTA-verta. Etsimme työpisteet, joista jäi ylijäämänäytteitä vain lyhyen jatkosäilytyksen jälkeen, jotta näytteet olisivat mahdollisimman tuoreita.

4.2 Näytteiden esikäsittely

Jääkaapeissa säilytetyt ylijäämänäytteet kerättiin yhteen, EDTA-veri yhdistettiin 50 ml sentrifugiputkeen ja laitettiin jäähtymään jäähauuteeseen. Yhdistetty ja jäähtynyt veri jaettiin kolmeen 7 ml:n erään, joista kahteen lisättiin 0,45 mM pyruvaattiliuosta (standardiliuos analyysikiteistä) vastaavan verimäärän poistamisen jälkeen. Lisätyt pitoisuudet laskettiin niin, että saatiin aikaan 50-200 µM keinotekoiset lisäykset näytteen pyruvaattipitoisuuteen. Pyruvaattilisäysten jälkeen jokaiseen näyteputkeen lisättiin mittalasilla 14 ml 8% perkloorihappoa (HUSLAB Liuoslaboratorio), joka oli esijäähdytetty jäähauuteessa. Välittömästi lisäyksen jälkeen näyteputkea sekoitettiin vortex-sekoittimella (vorteksonti) voimakkaasti. Näytteiden annettiin seistä 5 minuuttia lisäysten jälkeen. Jokaisen putken sisältö jaettiin kahteen 15 ml sentrifugiputkeen ja ne sentrifugoitiin 10°C 2600g 10 minuuttia (Hettich Rotixa 50RS, swing-bucket). Erottuneet supernatantit yhdistettiin, sekoitettiin, jaettiin 800 µl eriin tarroitettuihin säilytysputkiin ja pakastettiin -20°C.

4.3 Analyysi

Analyysissä käytettiin Instruchemien kittiä 2897 (lot 90250518 ja lot 91121118) pyruvaatin määrittämiseen kokoverestä entsyymaattisella menetelmällä. Kontrollina käytettiin Instruchemien korkean tason laktaatti/pyruvaattikontrollia 2896 (lot 53160217), josta tehtiin laimennos 1:2. Laimennoksella tehtyä matalan tason kontrollia tehtiin kaksi rinnakkaista sarjan alkuun ja loppuun. Korkean tason kontrolli ajettiin sarjan lopussa. Menetelmän vakiointiin käytettiin kitin mukana tulevaa 0,45 mM pyruvaattiliuosta, josta tehtiin 1:10 laimennos rinnakkaisina sarjan alkuun ja loppuun. Vakion ja kontrollien laimentamiseen käytettiin Merckin Milli-Q-järjestelmällä puhdistettua laboratoriovettä.

Joka viikko ajettiin yhden sarjan mukana myös ERNDIM (European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism) SAS (Special Assays in Serum) level 2 ulkoinen kontrolli (lot 53160217). Kaksi viimeistä viikkoa tätä kontrollia ajettiin jokaisessa sarjassa. Kylmäkuivatusta seerumista tehtiin pakkaseen valmiita kontrollieriä perkloorihapposaostuksella veteen liuottamisen jälkeen. Näytesarjaan otettiin tästä kontrollista yksi laimentamaton näyte ja yksi näyte, joka laimennettiin 1:2 laboratorioveteen.

Näytteet sulatettiin tuulettimen avulla ilmavirrassa noin 5-7 minuuttia sillä välin, kun laimennettiin ja saostettiin kontrollit. Saostukseen käytettiin 1 ml jääkylmää 8% perkloorihappoa (HUSLAB Liuoslaboratorio) 15 ml sentrifugiputkissa ja kontrollin lisäyksen jälkeen putket vorteksoitiin. Saostuksen jälkeen niitä seisotettiin jäähauteessa 5 minuuttia. Myös laimennettu vakio lisättiin perkloorihappoon ja vorteksoitiin. Sulaneet näytteet vorteksoitiin huolellisesti ja sentrifugoitiin saostettujen kontrollien kanssa 10°C 2600g 10 minuuttia. Sentrifugoinnin aikana merkittiin tarvittava määrä kyvettejä ja pipetoitiin laimennetut vakiot valmiiksi kyvetteihin. Fuugauksen jälkeen pipetoitiin kontrollit ja näytteet kyvetteihin. Näytemäärä kyveteissä oli 700 µl.

Käyttäen Eppendorf Multipette M4 toistopipettiä, pipetoitiin jokaiseen kyvetiin 175 µl kitin puskuriliuosta. Kyvetit vorteksoitiin lisäyksen jälkeen. Seuraavaksi pipetoitiin 175µl puskuriliuokseen liuotettua NADH-reagenssia kyvetteihin ja jälleen vorteksoitiin kyvetit. Seuraavaksi siirryttiin spektrofotometrille (Cary 100 Conc UV-Vis) mittaamaan absorbanssit 340 nm aallonpituudella (Abs0). Mittausten jälkeen lisättiin 17,5 µl LDH suspensiota ja vorteksoitiin kyvetit jokaisen lisäyksen jälkeen. Lisäykset ja niitä seurannut absorbanssin mittaaminen (Abs1) suoritettiin jokaisessa sarjassa 5 minuutin kuluttua siitä, kun ensimmäiset kymmenen kyvetiä oli pipetoitu.

Mittausten jälkeen saadut absorbanssiarvot siirrettiin tulosteilta MS Excel taulukkolaskentaohjelmaan, jonka avulla laskettiin pyruvaattipitoisuudet kussakin näytteessä. Tulosten laskentaan käytetty laskukaava on seuraava (Ranta 2020):

$$\text{näytteen pyruvaattipitoisuus } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\text{näyte}(Abs_0 - Abs_1)}{\text{vakio}(Abs_0 - Abs_1)} \times \text{vakion konsentraatio } (\mu\text{mol/l})$$

Käytetty analyysimenetelmä on mukautettu erikoiskemian laboratorion käyttöön kitin ohjeen perusteella.

5 Tulokset

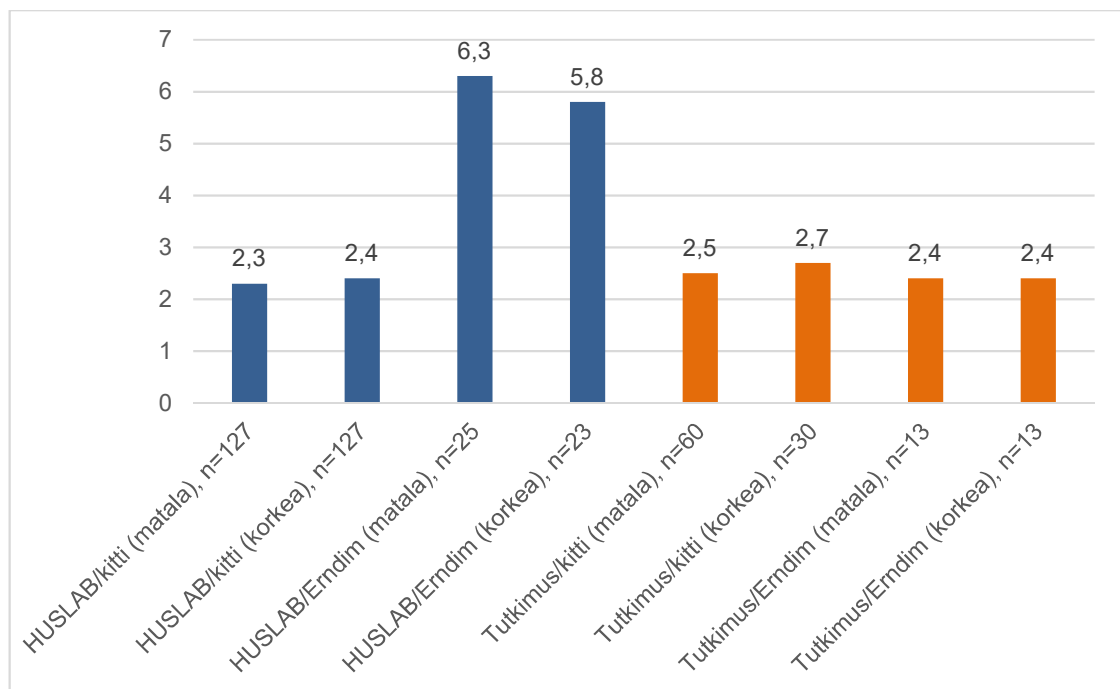
5.1 Laadunarviointi

Tutkimuksen aikana tehtiin 36 analyysisarjaa yhdeksän eri näyte-erän näytteistä, joista yksi erä käytettiin testausvaiheessa suunnitteluun ja harjoitteluun. Analysoitujen näytteiden kokonaismäärä oli 464. Jokaisessa sarjassa oli mukana kahdet vakiot, kahdet matalat kontrollit ja yksi korkea kontrolli. Sarjojen näytemäärät vaihtelivat välillä 1-9. Viikoittain analysoitiin myös ulkoinen SAS-kontrolli, joka otettiin mukaan kaikkiin sarjoihin kahdella viimeisellä viikolla. Kaikki näytteet, kontrollit ja vakiot analysoitiin rinnakkaisina.

Analyysisarjojen välisen toistuvuuden arviointia tehtiin kontrollien tulosten perusteella. Saatuja tuloksia verrattiin HUSLABin omiin pitkän aikavälin kontrollituloksiin. Nämä tulokset on esitetty taulukossa kaksi ja numeeriset arvot kuviossa neljä. Tuloksista nähdään, että sarjojen välinen toistuvuus on hyvin linjassa HUSLABin omien tulosten kanssa. Sarjojen ulkoiselle toistettavuudelle kittivalmistaja ei ilmoita arvoa.

Taulukko 2. Kontrollien tulokset (matala, korkea).

	HUSLAB KITTI (N=127)	HUSLAB SAS (N= 25/23)	TUTKIMUS KITTI (N=60/30)	TUTKIMUS SAS (N=13)
ka (µM)	71	90	73	96
sd	1,6	6	1,9	2,3
cv	2,3	5,8	2,5	2,4
ka (µM)	205	260	213	278
sd	4,8	15	5,7	6,8
cv	2,3	6,3	2,7	2,4



Kuvio 4. Sarjojen välinen toistuvuus – kittikontrolli ja Erndim SAS (CVväl%).

Sarjan sisäistä toistuvuutta arvioitiin yhdellä ensimmäisen viikon sarjoista, jossa yhtä saman pitoisuuden näytettä analysoitiin 16 kappaletta rinnakkain. Tätä yhden pitoisuuden näyte-erää (ka 118 µM) oli valmistettu riittävä määrä tutkimuksen harjoitteluun ja testaukseen. Analysoidun sarjan perusteella laskettu variaatiokerroin CVsis% oli 1,1%. Se saatiin laskemalla seuraavalla kaavalla:

$$CV_{sis}\% = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} \times 100\%$$

Lisäksi hyödynnettiin Dahlbergin menetelmää sarjojen sisäisen toistuvuuden arviointiin (Kallner – Theodorsson 2020; Kim 2013; Siloaho ym. 1997). Siinä tutkitaan sarjan jokaisen rinnakkaismittauksen välisen eron summaa. Käytetty laskukaava on seuraavanlainen:

$$D = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}, \text{ jossa } d = \text{duplikaatin korkeampi arvo} - \text{duplikaatin matalampi arvo}$$

Kaavassa n on sarjassa mitattavien duplikaattien määrä. Tällä kaavalla laskettiin viiden eri päivinä analysoidun sarjan (sarjojen näytteiden $n=12-14$) D :n arvoksi 0,8-3,2%. Keskiarvo näille tuloksille oli **1,5%**. Tulosta voidaan pitää erittäin hyvänä sarjojen sisäiselle vaihtelulle (VTT 2016).

Lisäksi laskettiin tutkimukselle kokonaisvariaatio kaavalla (Siloaho ym. 1997):

$$CV_{tot} = \sqrt{(kaCV(sis))^2 + kaCV(väl)^2}$$

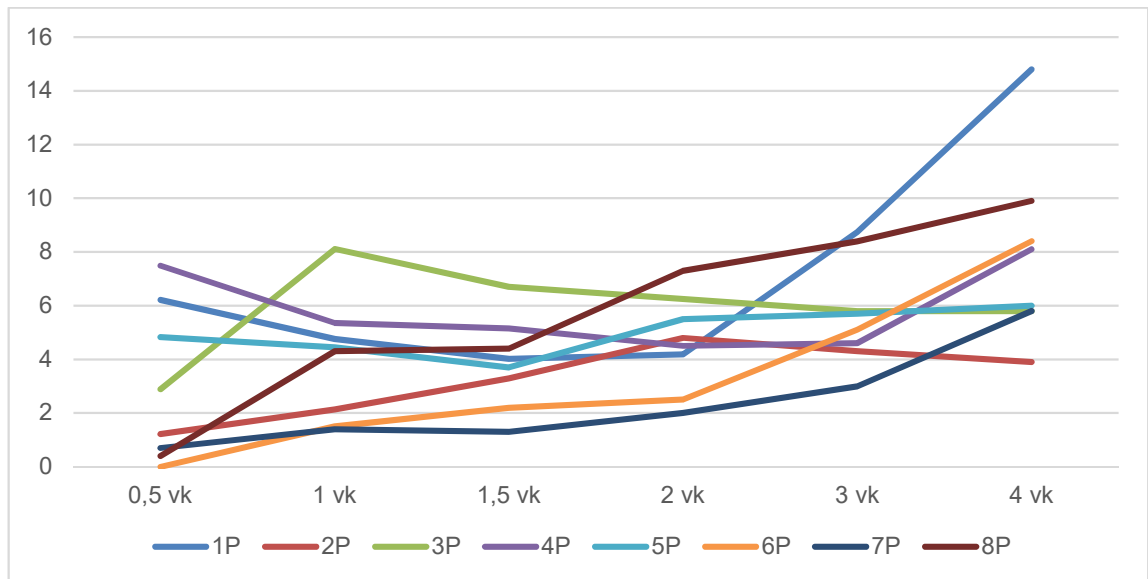
Tästä saadaan tulokseksi $ka(CV_{sis}\%) = 1,5\%$, $ka(CV_{väl}\%) = 2,5\%$; $CV_{tot} = \mathbf{2,9\%}$. Tämä tulos on myös hyvin linjassa niin HUSLAB kontrollitulosten kanssa ($CV_{väl} = 4,1\%$) ja sen perusteella tutkimuksessa tehtyjen analyysien toistettavuutta ja luotettavuutta voidaan pitää erittäin hyvänä.

5.2 Pyruvaatin säilyvyys näytteissä ilman lisäyksiä

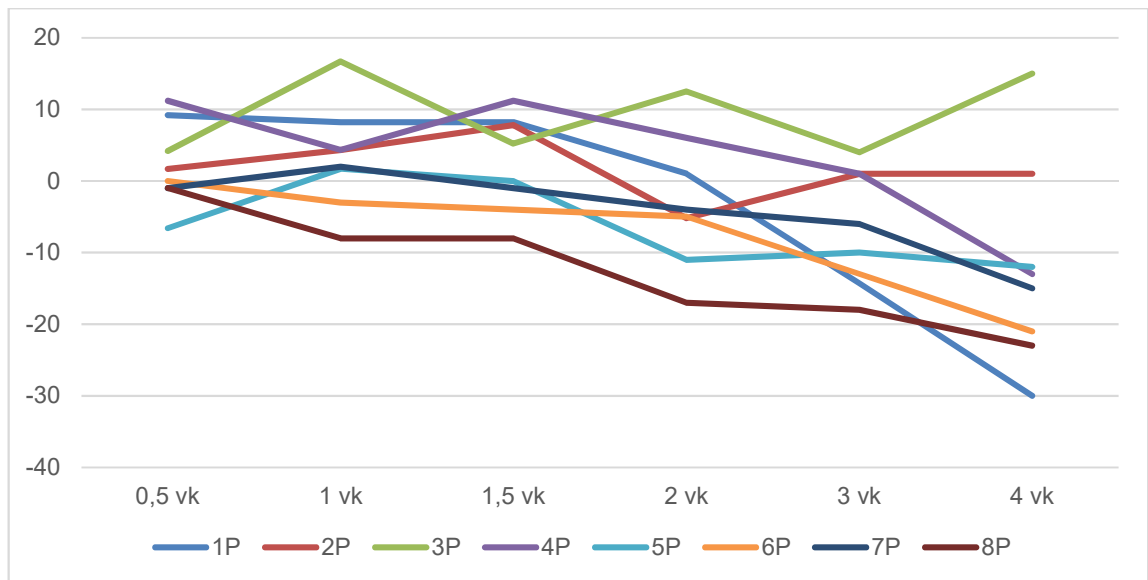
Niiden näytteiden osalta, joiden pyruvaattipitoisuutta ei ole keinotekoisesti nostettu (perusnäytteet), nähdään niin variaatiokertoimen (kuvio 5) ($CV\%$) kuin eroprosentin (kuvio 6) muutosten osalta laajaa vaihtelua näyte-erien kesken. $CV\%$:n muutokset pysyttelevät suurella osalla näytteistä tasaisina ensimmäiset 1,5 - 2 viikkoa, jonka jälkeen muutoksia alkaa näkyä. Sama voidaan todeta tarkastelemalla eroprosentteja, joissa verrataan tilannetta kussakin aikapisteessä lähtökonsentraatioon.

Kuviossa 7 on listattu mitatut pitoisuudet aikapisteittäin. Tässä nähdään sama muutos pitoisuuksissa kuin tarkasteltaessa variaatiokertoimia ja eroprosentteja kuvioissa 5 ja 6, mutta tässä korostuvat näyte-erien väliset pitoisuudet.

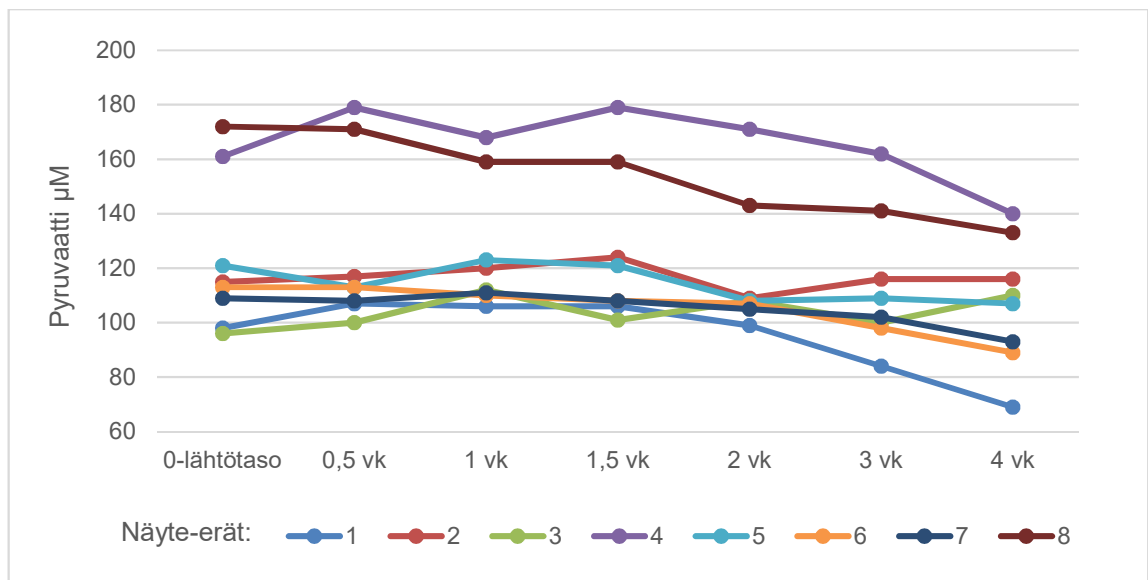
Suurimmat muutokset tapahtuivat erässä yksi, jonka pyruvaattipitoisuus neljännen viikon kohdalla oli laskenut 30% verrattuna muihin näyte-eriin, joilla muutokset olivat keskiarvoltaan noin -17%. Näyte-erä kolme oli myös poikkeava muihin verrattuna, sillä sen pitoisuus oli noussut 15%.



Kuvio 5. CV%:n muutos ajan suhteen perusnäytteillä (xP = näytepooli eli verinäytteitä yhdistämällä saatu seosnäyte).

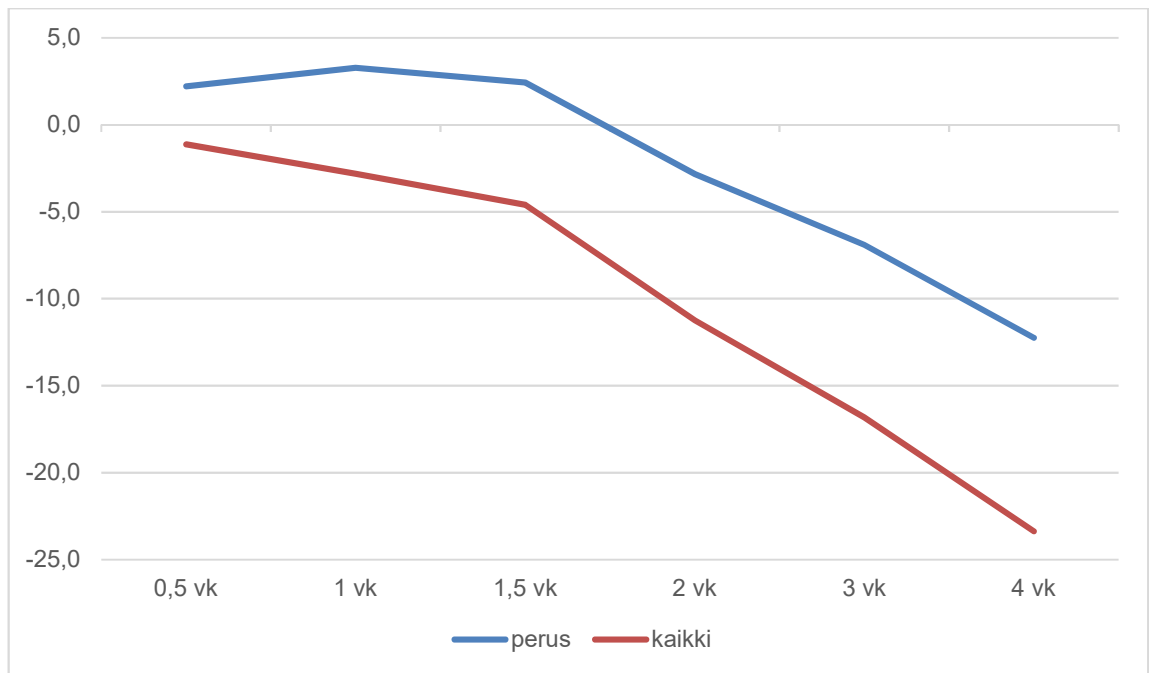


Kuvio 6. Eroprosentin muutos ajan suhteen perusnäytteillä.



Kuvio 7. Pyruvaattipitoisuuden muutos ajan suhteen perusnäytteillä.

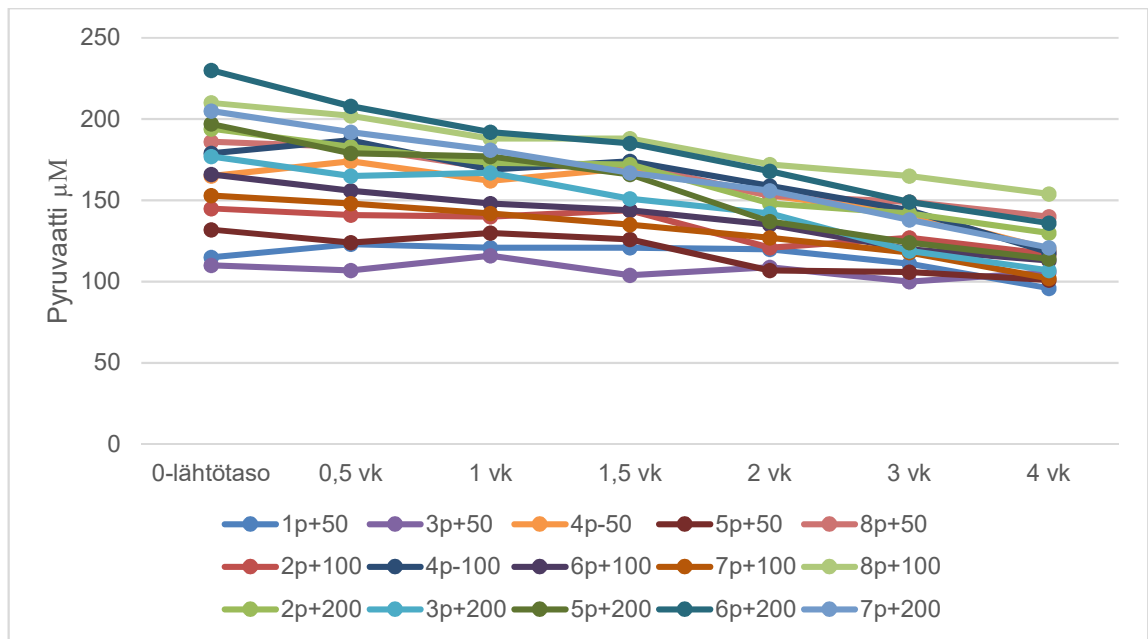
Alla on esitetty vielä keskiarvona eroprosentin muutokset ajan funktiona kaikille näytteille, sekä pelkille perusnäytteille.



Kuvio 8. Eroprosenttien keskiarvot ajan suhteen.

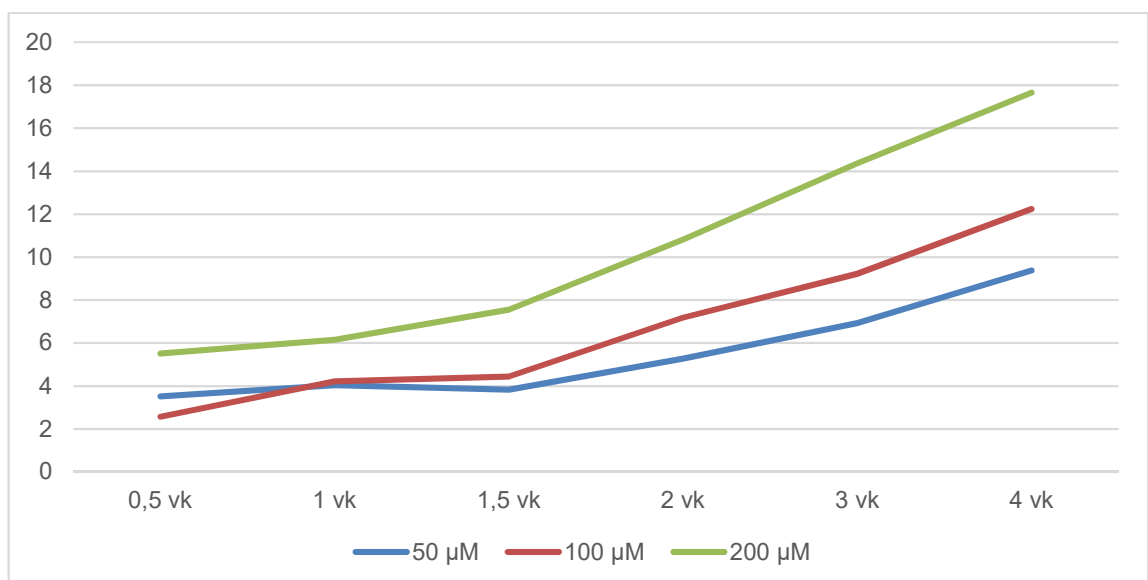
5.3 Pyruvaatin säilyvyys näytteissä, joihin on lisätty pyruvaattia

Tutkimuksessa haluttiin keinotekoisesti kasvattaa pyruvaattipitoisuuksien variaatiota eri näytteissä lisäämällä pyruvaattia tiettyihin näyte-eriin. Pitoisuuksia valittiin kolme (50 μM , 100 μM ja 200 μM) ja jokaista pitoisuutta analysoitiin viidessä eri näyte-erässä. Näiden näytteiden pitoisuuksien muutokset on esitetty kuviossa yhdeksän.



Kuvio 9. Pyruvaattipitoisuudet eri näyte-erillä aikapisteittäin (+x = pyruvaattilisäys µM).

Verrattuna perusnäytteisiin, suurempia pyruvaattipitoisuuksien muutoksia havaittiin jo tutkimuksen alkuvaiheessa näytteillä, joihin pyruvaattia oli lisätty. Kuviossa kymmenen on esitetty kaikkien lisäyksiä saaneiden näyte-erien variaatiokertoimen keskiarvon muutokset ajan suhteen. Voidaan havaita, että muutokset ovat suhteellisen samansuuntaisia riippumatta lisätystä pitoisuudesta. Muutosten jyrkkyys kasvaa kuitenkin suhteessa lisättyyn pitoisuuteen.



Kuvio 10. CV%:n muutos ajan suhteen näytteillä, joihin on lisätty pyruvaattia.

6 Tulosten tarkastelu

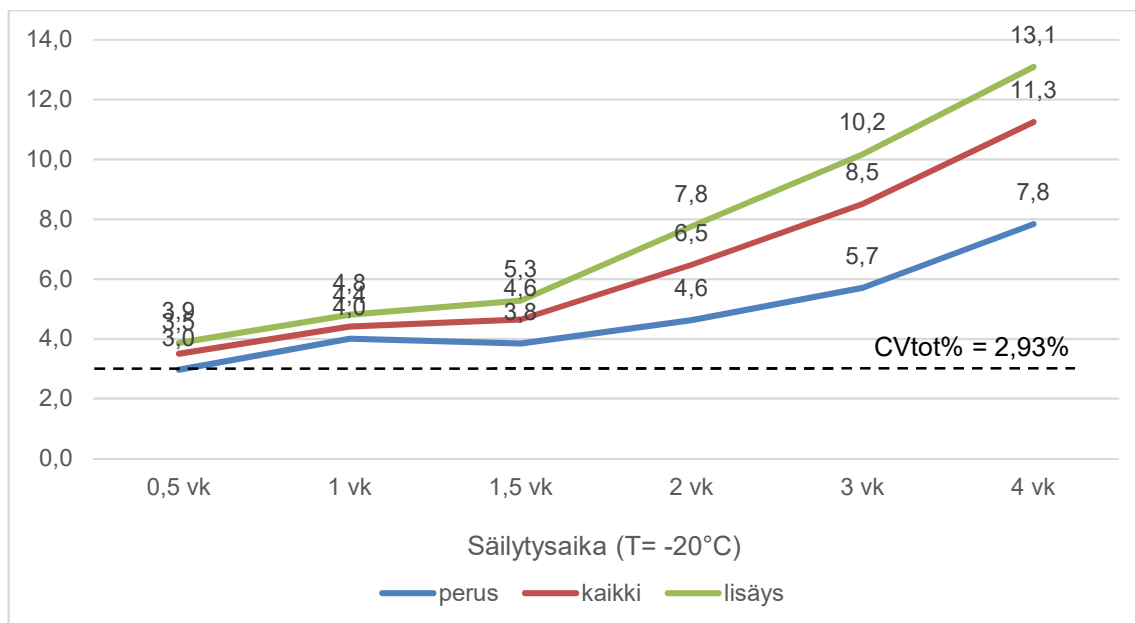
6.1 Tulosten luotettavuuden arviointi

Tutkimuksessa käytettyjä näyte-eriä oli kahdeksan. Näistä näyte-eristä kaksi oli keinotekoisesti lisätyin pyruvaattipitoisuuksin ja yksi ilman lisäyksiä. Lisättyjä pitoisuuksia oli 50 μM , 100 μM ja 200 μM , jokaista viisi kappaletta. Keinotekoisia pitoisuuden lisäyksiä haettiin tehdä siitä syystä, että nähtäisiin, onko korkeammilla pitoisuuksilla nopeampi pitoisuuden lasku samalla aikavälillä kuin matalammilla pitoisuuksilla.

Tutkimuksen edetessä haluttiin myös tarkistaa pyruvaattilisäyksen aiheuttamaa näytteen laimenemista ja sen vaikutusta, sillä huomattiin kaikkien keinotekoisesti nostettujen pitoisuuksien laskevan nopeammin suhteessa näytteisiin ilman lisäyksiä. Pieni näyte-erä valmistettiin kuten aiemmin on kuvattu, mutta käytettiin 2 mM pyruvaattiliuosta poistamatta verta näytteestä. Tilavuuden muutos tällä väkevämmällä liuoksella ei ollut merkittävä. Tämän näyte-erän säilyvyys oli samankaltainen kuin laimeampaa pyruvaattiliuosta käytettäessä, joten tilavuuden muutoksella ei nähty olevan vaikutusta säilyvyyteen.

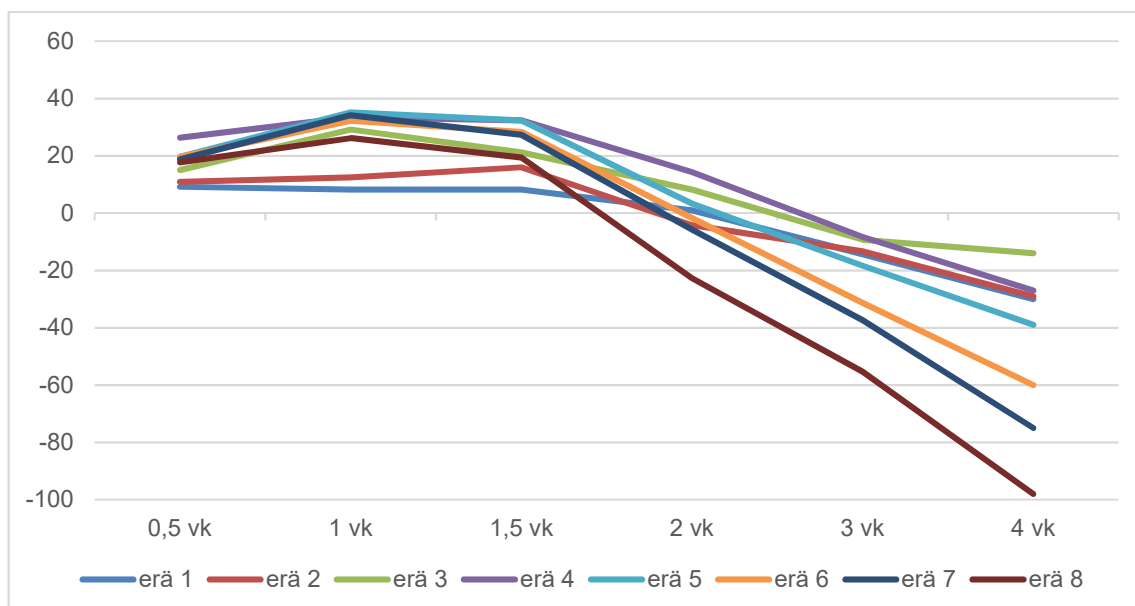
Toinen pienen näytemäärän testi tehtiin sillä oletuksella, että näytteille tapahtuvalla laimentamisella voisi olla vaikutusta säilyvyyteen. Tämän todentamiseksi valmistettiin kaksi eri näytettä, joista yksi oli laimentamaton ja toinen laimennettiin keittosuolaliuoksella suhteessa 1:3. Näiden eroprosentit verrattuna lähtötilanteeseen neljän viikon kohdalla olivat -9% ja -23%. Tästä voidaan päätellä, että laimentamisella olisi kuitenkin jokin säilyvyyteen vaikuttava tekijä ja se korostaa käsiteltyjen näytteiden tulosten epävarmuutta suhteessa perusnäytteisiin.

Kaikkien kahdeksan näyte-erän tuloksia tarkasteltaessa päädyttiin siis siihen, että ne näytteet, joihin oli lisätty keinotekoisesti pyruvaattia eivät käyttäytyneet samoin kuin perusnäytteet. Tämä voidaan havaita CV%:n huomattavasti jyrkemmästä noususta ja eroprosentin nopeasta laskusta näytteillä, joihin on lisätty pyruvaattia (kuviot 8, 10 ja 11). Tästä syystä näitä tuloksia ei otettu huomioon, kun arvioitiin tutkimuksen tulosten kliinistä merkitysevyyttä. Lisäksi todetaan, että pyruvaattipitoisuudet perusnäytteissä olivat osittain huomattavasti korkeampia kuin tutkimusta suunniteltaessa arvioitiin (odote noin 100 μM ja alle), joten pelkästään perusnäytteillä saatiin riittävää näyttöä eri konsentraatioiden käyttäytymisestä säilytyksen aikana. Perusnäytteiden kohdalla ei myöskään huomattu, että korkeammat pyruvaattipitoisuudet laskisivat alempia pitoisuuksia nopeammin ajan kuluessa.



Kuvio 11. CV %:n keskiarvot verrattuna CVtot%.

Tarkasteltaessa eroprosentin kasvua lähtötilanteen ja eri aikapisteiden välillä, voidaan todeta muutosten tapahtuvan noin 1,5 viikon säilytyksen jälkeen. Tämä oli yhtenäistä kaikille näyte-erille, mutta kuitenkin vaihtelu oli suurinta erityisesti kolmen ja neljän viikon kohdalla. Seuraavassa kuviossa on kuvattu kaikkien näyte-erien perusnäytteiden ero prosenttien muutokset toisiinsa suhteutettuna, jolloin nähdään selkeästi, miten eroavaisuudet kasvavat ajan mukana.



Kuvio 12. Toisiinsa suhteutetut ero prosenttien muutokset näytteillä ilman pyruvaattilisää.

SPSS Statistics ohjelmalla tutkittiin näyte-erien pyruvaattipitoisuuden muutoksia näytteille ilman lisättyä pyruvaattia tekemällä kahden riippuvan otoksen t-testi eri aikapistteillä. Tässä testissä verrataan kahden aikapistteen tulosten keskiarvojen eron merkittävyyttä (Weisstein 2020). Testin tulokset on taulukoitu alla. Merkitsevyytason p-arvoa tarkasteltaessa voidaan todeta, että tulosten eron merkitsevyys nousee tilastollisesti merkitseväksi ($p < 0,050$) vasta neljän viikon kohdalla.

Taulukko 3. SPSS Statistics t-paired samples analyysi näytteille ilman pyruvaattilisäyksiä.

	PARILLISTEN TULOSTEN EROT					t	df	MERKITSEVYYSTASO (p-arvo)
	ka	sd	keskivirheen ka	Erojen luottamusväli (95%)				
				matala	korkea			
0,5 VKO	-2,9	7,8	2,8	-9,4	3,6	-1,044	7	0,331
1 VKO	-3,0	8,5	3,0	-10,1	4,1	-0,996	7	0,352
1,5 VKO	-2,6	9,5	3,4	-10,6	5,3	-0,78	7	0,461
2 VKO	4,4	13,0	4,6	-6,5	15,3	0,949	7	0,374
3 VKO	9,1	11,5	4,1	-0,5	18,7	2,243	7	0,06
4 VKO	16,0	16,8	5,9	1,9	30,1	2,691	7	0,031

6.2 Tulosten käytettävyyden arviointi

Tulosten kliinisen merkittävyyden arvioinnin teki tutkimuksesta vastaava erikoislääkäri Tuukka Helin yhdessä kemisti Sirpa Rannan kanssa. He hyödynsivät muun muassa Westgardin biologisen variaation taulukkoja eri analyteille (Westgard 2014). Taulukon lähteenä käytetyn tutkimuksen mukaan biologinen variaatio pyruvaatille olisi noin 15 % (Panteghini – Pagani 1993). Tämä variaatio on samaa luokkaa mitattuna saman yksilön eri näytteistä tai eri henkilöiden näytteiden kesken. Tämä auttoi ymmärtämään eri näyteerien välistä vaihtelua alkukonsentraatioille. Pohdinnasta saatujen tietojen mukaan, tutkimuksessa havaitut muutokset pyruvaattipitoisuuksissa kasvavat kliinisesti merkittäviksi vasta kolmannen viikon jälkeen, kun ne suhteutetaan tähän biologiseen variaatioon.

Variaatiokertoimen hajonta perusnäytteillä jää matalaksi, kun sitä verrataan biologisesta variaatiosta johtuvaan vaihteluun. Hajonta on kahden viikon kohdalla 2,6-6,2%, kolmen viikon kohdalla 3,0-8,7% ja neljännellä viikolla 5,8-14,8%.

Yhden pyruvaattimäärityksestä tehdyn tutkimuksen osana tehdyssä pienen näytemäärän (n=3) säilyvyyskokeilussa todettiin, että 15 päivän sisällä analysoiduilla näytteillä pyruvaattipitoisuuden muutos jää alle kaksi kertaa näytteiden välisen keskihajonnan

(Wulkan – Verwers – Neele 2001). Tämä on linjassa tässä raportissa esitettyjen tulosten kanssa.

Tämän tutkimuksen perusteella ja esitetyn tiedon pohjalta voidaan todeta, että pyruvaattipitoisuudessa ei tapahdu merkittäviä muutoksia alle kahden viikon säilytyksessä. Kolmen viikon kohdalla tapahtuneet muutokset eivät ylitä kliinisen merkittävyyden rajaa ja vasta neljän viikon kohdalla havaittiin muutoksia joiden CV%:n hajonta ylittää 10% ja ne alkavat olla merkittäviä. HUSLAB ohjeistusta tullaan muuttamaan tämän tiedon perusteella niin, että näytteet analysoidaan mahdollisuuksien mukaan kahden viikon aikana näytteenotosta ja viimeistään alle kolmen viikon kuluessa (Ranta 2020).

7 Pohdinta

Tutkimukseen saatiin haluttua eroavaisuutta eri näyte-erien välillä, vaikka päädyttiinkin käyttämään ylijäämäverinäytteitä. Täyttä varmuutta näyte-erien välisestä erosta ei ollut tutkimuksen alkuvaiheessa, sillä tällaisten pidemmän aikaa säilytettyjen verinäytteiden pyruvaattipitoisuutta ei ole tutkittu. Tutkimuksessa käytetty näytemateriaali ei ole täysin edustavaa oikeisiin pyruvaattinäytteisiin verrattuna tämän pidemmän säilytyksen takia, koska ei voida tietää mitä muutoksia verinäytteissä tapahtuu säilytyksen aikana. Varsinaisessa pyruvaattinäytteiden näytteenotossa on ensisijaisen tärkeää, että otettu verinäyte saostetaan perkloorihapolla välittömästi näytteenoton jälkeen. Tällä estetään pyruvaattipitoisuuden muuttuminen pysäyttämällä entsyymitoiminta, jolloin mitattu pyruvaattipitoisuus kuvaa näytteenottohetkeä. Tämä ei toteudu näiden ylijäämänäytteiden kohdalla. Eri näytteiden yhdistämisessä mahdollisesti tapahtuvat reaktiot ja niiden vaikutus pyruvaattimääritykseen jää myös tuntemattomaksi. Tehdyssä tutkimuksessa entsyymitoiminta pysäytettiin kuitenkin juuri ennen pakastusta, joten voidaan olettaa, että aiemman säilytyksen aikaiset muutokset pyruvaatissa eivät olleet oleellisia tutkimuksen tavoitteelle.

Käytettyjen näytteiden hemolyysin, eli punasolujen hajoamisen määrässä on todennäköisesti suurta hajontaa. Hemolyysiä ei mitattu muodostetuista näyte-eristä. Hemolyysin tiedetään kuitenkin vaikuttavan pyruvaattimittauksen tuloksiin soluista vapautuvien entsyymien ja aineenvaihduntatuotteiden kautta ja hemolyysiä tapahtuu pitkään säilytyksissä verinäytteissä (Dimeski ym. 2011; Chuang ym. 2006).

Glykolyysi jatkuu myös näytteenoton jälkeen useiden tuntien ajan ja kuluttaa glukoosia plasmasta muodostaen pyruvaattia (Monneret ym. 2016). Tämä voi selittää joissain

näyte-erissä todettuja korkeampia pyruvaattipitoisuuksia, kun hemolyysin määrä on lisääntynyt ja glykolyysi on saanut jatkoa loppuun.

Tutkimuksen suunnitteluvaiheessa pohdittiin myös, miksi esikäsiteltyjen SAS-kontrollien pitoisuudet eivät muutu säilytyksen aikana. Ne eivät ole kokoverinäytteitä, vaan kylmäkuivattuja seeruminäytteitä, mikä osaltaan selittää eroa säilyvyydessä. Käyttöä varten kylmäkuivatut seeruminäytteet liuotetaan laboratorioveteen, jonka jälkeen ne saostetaan perkloorihapolla ja sentrifugoidaan kuten muutkin kontrollit. Valmiita kontrolliliuos-eriä säilytetään pakastimessa jopa useita viikkoja ennen käyttöä. Voidaan siis miettiä, että jokin tekijä kokoverinäytteissä vaikuttaa pyruvaattipitoisuuden alenemiseen vaikkakin entsyymitoiminta on lopetettu proteiinisaostuksella. Yksi säilyvyyteen vaikuttava tekijä voisi olla näytteisiin happokäsittelyn aikana oksyhemoglobiinista muodostuva vetyperoksidi, joka lisää pyruvaatin hapettumista hiilidioksidiksi ja asetaatiksi (Gallemann – Eyer 1990).

Toinen säilyvyyteen mahdollisesti vaikuttava tekijä on sentrifugointiaika ja käytetty sentrifugoinnin teho. Tutkimusta varten valmistetut näyte-erät jaettiin kahteen 15 ml sentrifugiputkeen proteiinisaostuksen jälkeen erottelua varten. Näytemäärä jokaisessa putkessa oli noin 10 ml. Sentrifugoinnin jälkeen näytteissä esiintyi silmin havaittavia määriä sakkua sulatuksen jälkeen. Tämä sakka oli helppo havaita siinä vaiheessa, kun sulatetut ja sentrifugoidut näytteet pipetoidaan kyvetteihin. Sentrifugointiajan ja -tehon nostaminen lisää todistetusti joidenkin analyyttien säilyvyyttä plasmassa (Dimeski ym. 2011). On kuitenkin vaikea sanoa lisäksi se pyruvaattinäytteiden säilyvyyttä merkittävästi.

Lisäksi verinäytteissä esiintyy yksinkertaisempia orgaanisia ja epäorgaanisia aineita, jotka eivät poistu esikäsitelyssä, vaan pysyvät liuenneena happamassa supernatantissa. Ilman tarkempaa tutkimusta on kuitenkin mahdoton sanoa, ovatko nämä aineet sellaisia, jotka vaikuttavat näytteiden säilyvyyteen tai häiritsevät analyysiä.

Analyysikitin ohjeessa mainitaan näytteiden pyruvaattipitoisuuden säilyvän stabiilina yhden kuukauden verran jääkaappilämpötilassa (2-6°C), jos näytteet puskuroidaan sentrifugoinnin ja erottelun jälkeen kitin mukana tulevalla puskurilla suhteessa 4:1 (Instruchemie 2017). Tämä olisi kuitenkin erittäin haasteellista toteuttaa käytännössä, koska puskurin lisäys pitäisi tehdä heti erottelun jälkeen ja se vaatisi taas lisää osaamista näytteiden käsittelijöille sekä puskurin jakamista pyruvaattinäytteitä ottaviin paikkoihin.

Tutkimuksen näyttemateriaalista saatujen tulosten koettiin kuitenkin olevan riittävän tarkkoja tutkimuksen tavoitteisiin pääsemiseksi. Näytteiden pitoisuudella nollatilanteessa ei ollut ratkaisevaa merkitystä, kun haluttiin tarkastella vain esikäsiteltyjen näytteiden säilyvyyttä pidemmällä aikavälillä.

8 Tutkimuseettiset näkökohdat

Aineenvaihduntatautien diagnostiikkaa tehdään lähinnä nuorille ja vastasyntyneille lapsille ja ideaalisesti näyttemateriaali kuvastaisi myös tätä. Näytteiden säilyvyyttä tarkasteltaessa ei kuitenkaan ole merkittävää, että näyttemateriaali olisi nimenomaan tutkimuksen pääasialliselta kohderyhmältä. Biologisen variaation aiheuttamat erot pyruvaattipitoisuudessa eivät ole niin merkittäviä, että tutkimusta ei voitaisi tehdä täysi-ikäisten henkilöiden verinäytteistä. Tällöin säästyään siltä ongelmalta, että tarvittaisiin suuria määriä verinäytteitä pieniltä lapsilta.

Alkuperäisen suunnitelman mukaisesti tähän tutkimukseen olisi käytetty vapaaehtoisten täysi-ikäisten henkilöiden anonyymisti luovuttamaa verta. Tutkimuslupaa haettaessa todettiin kuitenkin, että sen kaltainen tutkimus, jossa otetaan verinäytteitä vain tutkimustarkoitusta varten, ylittää opinnäytetyölle asetetut rajat. Tästä syystä suunnitelmaa muutettiin ja tutkimus päädyttiin suorittamaan kaiken ikäisten henkilöiden anonyymeillä ylijäämäverinäytteillä.

Tutkimukseen liittyvässä tiedonhaussa pyrittiin hyödyntämään mahdollisuuksien mukaan uusinta saatavilla olevaa tietoa. Tutkimuslupa haettiin HUS:in määrittämien ohjeiden mukaisesti opinnäytetyötä varten. Potilasnäytteiden tietosuojasta huolehdittiin hävittämällä näyteputket asianmukaisesti ohjeistetulla tavalla tietosuojattuun biologiseen jäteteeseen. Tutkimuksessa itsessään ei ollut mitään tarvetta tallentaa käytettyjen näytteiden potilastietoja eikä niitä käsitelty tutkimuksen aikana. (TENK 2012.)

9 Lähteet

Cayman Chemical 2016. Pyruvate Assay Kit 700470. Verkkodokumentti.
<<https://www.caymanchem.com/product/700470/pyruvate-assay-kit>>. Luettu 20.3.2020.

Chuang, Chih-Kuang – Wang, Tuen-Jen – Yeung, Chun-Yan – Hsieh, Wen-Shyang – Lin, Dar-Shong – Hob, Shinn-Chamg – Lin, Shuan-Pei 2006. Interference and blood sample preparation for a pyruvate enzymatic assay. *Clinical Biochemistry* vol 39. s 74–77. Elsevier.

De Meirleir, Linda J. – Van Coster, Rudy – Lissens, Willy 2006. Disorders of Pyruvate Metabolism and the Tricarboxylic Acid Cycle. *Inborn Metabolic Diseases* 4. painos. s. 161-174. Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Debray, Francois-Guillaume – Mitchell, Grant A. – Allard, Pierre – Robinson, Brian H. – Hanley, James A. – Lambert, Marie 2007. Diagnostic Accuracy of Blood Lactate-to-Pyruvate Molar Ratio in the Differential Diagnosis of Congenital Lactic Acidosis. *Clinical Chemistry*. vol.53 s. 916–921.

Dimeski, Goce – Solano, Connie – Petroff, Mark K. – Hynd, Matthew 2011. Centrifugation protocols: tests to determine optimal lithium heparin and citrate plasma sample quality. *Annals of Clinical Biochemistry* vol 48. s 218.

Feldman, Amy G. – Sokol, Ronald J. – Hardison, Regina M. – Alonso, Estella M. – Squires, Robert H. – Narkewicz, Michael R. 2017. Lactate and Lactate:Pyruvate Ratio in the Diagnosis and Outcomes of Pediatric Acute Liver Failure. *The Journal of Pediatrics*. vol. 182. s. 217-222.

Fimlab 2018. Pyruvaatti, kokoverestä – ohjekirjateksti. Fimlab. Verkkodokumentti.
<https://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tmp?sivu_id=194;setid=6469>. Luettu 4.11.2019.

Galleman, Dieter – Eyer, Peter 1990. Formation of Hydrogen Peroxide during Precipitation of Red Cells with Perchloric Acid - A Cautionary Note for Precise Determination of Pyruvate, GSH, and NAD(P)H. *Analytical Biochemistry*. vol 191. s 347-353.

García-Cazorla, Angels – Rabier, Daniel – Touati, Guy – Chadeaux-Vekemans, Bernadette – Marsac, Cécile – de Lonlay, Pascale – Saudubray, Jean-Marie 2006. Pyruvate Carboxylase Deficiency: Metabolic Characteristics and New Neurological Aspects. *Annals Neurology*. vol. 59. s. 121-127.

Instruchemie 2017. Determination of pyruvate in whole blood. Skannattu analyysikitin ohje.

Kallner, Anders – Theodorsson, Elvar 2020. An experimental study of methods for the analysis of variance components in the inference of laboratory information. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. vol 8. s 73-80. Taylor & Francis.

Kim, Hae-Young 2013. Statistical notes for clinical researchers: Evaluation of measurement error 2: Dahlberg's error, Bland-Altman method, and Kappa coefficient. Open lecture on statistics - Restorative Dentistry & Endodontics. s 182-185.

Litwack, Gerald 2018. Glycolysis and Gluconeogenesis. Human Biochemistry. s. 183-198. Academic Press, Elsevier.

Monneret, Denis – Godmer, Alexandre – Le Guen, Ronan – Bravetti, Clotilde – Emerald, Cecile – Marteau, Anthony – Alkouri, Rana – Mestari, Fouzi – Dever, Sylvie – Imbert-Bismut, Françoise – Bonnefont-Rousselot, Dominique 2016. Stability of Routine Biochemical Analytes in Whole Blood and Plasma From Lithium Heparin Gel Tubes During 6-hr Storage. Journal of Clinical Laboratory Analysis vol 30. s 602–609. Wiley.

Myers, Jerome L. – Well, Arnold D. – Lorch Jr, Robert F. 2013. Research Design and Statistical Analysis – Developing the fundamentals of hypothesis testing using the binomial distribution. New York: Routledge, 3. painos. 4. kappale.

Panteghini, Mauro – Pagani, Franca 1993. Biological Variation of Lactate and Pyruvate in Blood. Clinical Chemistry vol 39. s 906.

Ranta, Sirpa 2019. Pyruvaatti, verestä – ohjekirjateksti. HUSLAB. Verkkodokumentti. <<https://huslab.fi/ohjekirja/2554.html>>. Luettu 4.11.2019.

Ranta, Sirpa 2020. Kemisti, HUSLAB. Tutkimuksen suorittamiseen ja raportointiin liittyvät keskustelut. Suullinen tiedonanto. 13.1.2020-17.4.2020. Helsinki.

Rivinoja, Antti 2018. Pyruvaatti, verestä – ohjekirjateksti. NordLab. Verkkodokumentti. <<http://oyslab.fi/ohjekirja/2554.html>>. Luettu 4.11.2019.

Siloaho, Maritta – Elg, Peter – Leppänen, Esa – Loikkanen, Minna – Puukka, Raija – Ruopuro, Marja-Leena – Saarmala, Hannu 1997. Ohjeita mittausepävarmuuden arvioimiseksi ja laskemiseksi kliinisen kemian laboratoriossa. Moodi. vol 4. s 196-203.

TENK 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa – tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje 2012. Verkkodokumentti <https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf>. Luettu 12.10.2019.

Tondo, Mireia – Valencia-Marin, Isaac – Ma, Qian – Pascual, Juan M. 2015. Pyruvate Dehydrogenase, Pyruvate Carboxylase, Krebs Cycle and Mitochondrial Transport Disorders. Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease 5. painos. Elsevier.

TYKSLAB 2016. Laktaatti-pyruvaatti -suhde. Verkkodokumentti. <<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=426>>. Luettu 4.11.2019.

Van Wijk, Richard – van Soling, Wouter W. 2005. The energy-less red blood cell is lost - erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* by the American Society of Hematology. vol 106. nro 13.

Vazquez, Alexei 2018. Overflow Metabolism in Human Disease. From Yeast to Marathon Runners. s. 53-62. Elsevier.

Weisstein, Eric W. 2020. Paired t-Test. Verkkodokumentti. <<https://mathworld.wolfram.com/Pairedt-Test.html>>. Luettu 27.2.2020.

Westgard 2014. Desirable Biological Variation Database. Verkkodokumentti. <<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>>. Luettu 15.3.2020.

Voet, Donald – Voet, Judith G. – Pratt, Charlotte W. 1999. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley & Sons.

VTT 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Verkkodokumentti. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Luettu 12.2.2020.

Wulkan, Raymond W. – Verwers, Renee – Neele, Marjolein – Mantel, Mart J. 2001. Measurement of pyruvate in blood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Annals of Clinical Biochemistry. vol 38. s 554-558.