



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Joakim Fjäder & Juuso Kohonen

ApoA1 ja ApoB -apolipoproteiinit

Tulosten ja säilyvyyden vertailu seerumin ja plasman välillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

19.04.21

Tekijä(t) Otsikko	Joakim Fjäder & Juuso Kohonen ApoA1 ja ApoB-apolipoproteiinit
Sivumäärä Aika	29 sivua + 4 liitettä 19.04.2021
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Jaana Anttila Lehtori Kirsi-Marja Kartastenpää-Wihlman
<p>Lipoproteiinit ovat maksassa ja suolen seinämässä muodostuvia pallomaisia hiukkasia, jotka koostuvat kolesterolista, triglyserideistä, fosfolipideistä ja proteiineista. Lipoproteiinit jaetaan viiten ryhmään muun muassa kokonsa ja tehtävänsä mukaan; kylomikronit, VLDL (very low-density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) ja HDL (high density lipoprotein). Lipoproteiinien proteiiniosia kutsutaan apolipoproteiineiksi, joista kliinisesti tärkempiä ovat ApoA1 ja ApoB.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoitus on tutkia ja vertailla ApoA1 ja ApoB apolipoproteiinien säilyvyseroa seerumi- ja plasmanäytteissä sekä tutkia seerumin ja plasman välisten ApoA ja ApoB pitoisuuksien eroavaisuutta.</p> <p>Kaksi tärkeintä tutkimuskysymystä, joihin vastaamme opinnäytetyössämme ovat:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Onko seerumista ja plasmasta mitatuissa ApoA1 ja ApoB pitoisuuksissa tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta? 2. Onko näytteiden säilytysajalla tilastollista merkittävyyttä plasman ja seerumin ApoA1 ja ApoB pitoisuuteen? <p>Tutkimuksessa saadut tulokset on saatu suorittamalla mittauksia Metropolian biokemianluokan tiloissa. Tutkimuksessa käytettävät näytteet kerättiin Metropolian Ammattikorkeakoulun Myllypuron kampuksen oppilailta, opettajilta ja työntekijöiltä laatimamme sopimuksen mukaisesti.</p> <p>Mittausten perusteella oli havaittavissa, että tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta oli pakastimessa säilytettyjen seerumin ApoB ja plasman ApoB pitoisuuksien välillä. Eroavaisuutta havaittiin myös vertailtaessa tuorenäytteestä mitattua seerumin ApoA1 pitoisuutta pakastimessa säilytettyyn seerumin ApoA1 pitoisuuteen.</p>	
Avainsanat	Apolipoproteiini, ApoA1, ApoB, luotettavuus, säilyvyys, vertailu, pitoisuus

Author(s) Title	Joakim Fjäder & Juuso Kohonen ApoA1 & ApoB-apolipoproteins
Number of Pages Date	29 pages + 4 appendices 19.04.2021
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Jaana Anttila, Lecturer Kirsi-Marja Kartastenpää-Wihlman, Lecturer
<p>Lipoproteins are spherical particles that are formed in the liver and intestinal wall. They consist of cholesterol, triglycerides, phospholipids and proteins. Lipoproteins are divided into five groups according to their size and function. The five groups are chylomicrons, VLDL (very low-density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) and HDL (high density lipoprotein). Apolipoproteins are the protein parts of lipoproteins. Clinically the most important apolipoproteins are ApoA1 and ApoB.</p> <p>The purpose of this thesis is to study and compare the persistence of ApoA1 and ApoB lipoproteins in serum and plasma samples. The intent is also to study the difference in serum and plasma concentrations of ApoA and ApoB.</p> <p>The two most important research questions we answer in our thesis are:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Is there statistically significant difference in the concentration of ApoA1 and ApoB when they are measured from serum or plasma. 2. Does the storage time of serum and plasma affect statistically significantly to the ApoA1 and ApoB levels of the samples? <p>The results in this study were obtained by performing measurements in Metropolia's biochemistry class. The samples used in the study were collected from the students, teachers and employees of Metropolia University of Applied Sciences. All participants in the study agreed to participate by signing a contract.</p> <p>Based on the measurements, it was observed that there was a statistically significant difference between the concentrations of ApoB in serum and ApoB in plasma when the samples were stored in the freezer. A difference was also observed when the concentration of ApoA1 in fresh serum sample was compared to a concentration of ApoA1 in frozen serum sample.</p>	
Keywords	Apolipoprotein, ApoA1, ApoB, reliability, stability, comparison, concentration

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Tarkoitus ja tavoitteet	2
3	Lipoproteiinit ja apolipoproteiinit	3
3.1	Apolipoproteiini A1	3
3.2	Apolipoproteiini B	4
4	Apolipoproteiinien määrittäminen	5
4.1	Preanalytiikka	5
4.2	Plasma ja seerumi	6
4.3	Analytiikka ja analyysimenetelmä	7
4.4	Postanalytiikka	8
4.5	Verinäytteiden säilyvyys	8
5	Aikaisempia tutkimuksia	9
5.1	Apolipoproteiinien A1 ja B immunoturbidometrinen määrittäminen seerumista	9
5.2	24:n analyysin säilyvyystutkimus plasmasta ja seerumista	11
5.3	Kemiallisten ja immunokemiallisten analyysien säilyvyystutkimus	11
6	Tutkimuksen toteutus	12
6.1	Näytteiden käsittely	12
6.2	Tulosten analysointi	13
6.3	Tiedonhaku	15
6.4	Suostumusasiakirjan laatiminen	15
7	Tulokset	15
8	Pohdinta	22
8.1	Tulosten tarkastelu	22
8.2	Johtopäätökset	23
8.3	Tutkimuksen eettisyys	24
8.4	Lähteiden eettisyys ja lähdekritiikki	24
8.5	Luotettavuus	25
8.6	Ammatillinen kasvu	25
	Lähteet	27

Liitteet

Liite 1. Suostumusasiakirja näyttemateriaalin luovutukseen

Liite 2. Mittaustulokset; tuorenäytteet huoneenlämpöisenä

Liite 3. Mittaustulokset; kolmen päivän säilytys jääkaapissa

Liite 4. Mittaustulokset; 3 kuukauden säilytys pakastimessa

1 Johdanto

Lipoproteiinit ovat maksassa ja suolen seinämässä muodostuvia pallomaisia hiukkasia, jotka koostuvat kolesterolista, triglyserideistä, fosfolipideistä ja proteiinista. Lipoproteiinit jaetaan viiten ryhmään muun muassa kokonsa ja tehtävänsä mukaan; kylomikronit, VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) ja HDL (high density lipoprotein). Lipoproteiinien proteiiniosia kutsutaan apolipoproteiineiksi, joista kliinisesti tärkempiä ovat ApoA1 ja ApoB. (Syväne 2015.)

Apolipoproteiinit A1 ja B voidaan määrittää kliinisen kemian analysaattoreilla (Leiviskä ym. 2014). Kolesterolin ohella niitä mitataan arvioimaan sydän- ja verisuonitautien riskiä, erityisesti ylipainoisilla, diabeetikoilla sekä kolesterolia alentavan lääkehoidon yhteydessä (Terveystieteiden tutkimuskeskus ja hyvinvoinnin laitos 2011). Ne ovat myös osa dyslipidemioiden eli veren rasva-ainevaihdunnan häiriöiden Käypä hoito –suositusta. Dyslipidemioiden hoidossa on päätavoitteena ehkäistä ateroskleroottista valtimotautia (Duodecim Käypä hoito 2020).

Kliininen kemia on kvantitatiivinen tiede, joka tutkii biologisesti tärkeiden aineiden (analyttien) määriä kehon nesteistä. Kliinisen kemian tuloksia käytetään kliinisen merkityksen sekä diagnoosin saamiseksi. Kliinisessä kemiassa hyödynnetään erilaisia analyttisiä tekniikoita, kuten spektrofotometriaa, elektroforeesia ja entsyymiaktiiviteettien mittausta. Työ vaatii tekijältään niin manuaalisten kuin automaatiolla toimivien tekniikoiden hallintaa. (Abbott Laboratories 2020.)

Tässä opinnäytetyössä tutkitaan ja vertaillaan ApoA1 ja ApoB-apolipoproteiinien seerumi- ja plasmanäytteistä eri aikaväleillä tehtyjen mittausten antamia pitoisuuksia. Näyttemateriaalin kerääminen sekä näytteiden analysointi on suoritettu kokonaisuudessaan Metropolian Myllypuron kampuksella. Analyyseissä on käytetty koulun biokemian luokan Indiko™ Plus -kliinisen kemian analysaattoria. Opinnäytetyö on tehty yhteistyössä Metropolian ammattikorkeakoulun kanssa hyödyntämään koulun biokemian opetusta.

2 Tarkoitus ja tavoitteet

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on vertailla ApoA1- ja ApoB-apolipoproteiinien seerumi- ja plasmanäytteistä eri aikaväleillä tehtyjen mittausten antamia pitoisuuseroja. Tämän lisäksi vertailemme seerumin ja plasman välisiä ApoA1 ja ApoB pitoisuuseroja. Tutkimusta varten kerättiin 22 seeruminäyteputkea ja 22 plasmanäyteputkea, jotka sentrifugoitiin. Tämän jälkeen jaoimme jokaisesta putkesta mitattavan näyttemateriaalin eli plasman/seerumin kolmeen erilliseen putkeen; yksi tuoreanalyysia, yksi 3 vuorokautta jääkaapissa olleen näytteen analyysia ja yksi 3 kuukautta pakastimessa olleen näytteen analyysia varten.

Otimme ylös jokaisen analyysikerran yhteydessä ApoA1 ja ApoB lipoproteiinien pitoisuusarvoja, joita käsitelimme käyttäen Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmaa. Vertailimme taulukoimiamme tuloksia keskenään, josta syntyi lopulta opinnäytetyömme lopputulos. Tutkimuksissa käytettävät näytteet kerättiin Metropolia ammattikorkeakoulun Myllypuron kampuksen opettajilta, henkilökunnalta ja opiskelijoilta laatimamme sopimus-pohjan mukaisesti.

Tutkimuksen tavoitteena on tulosten avulla tuottaa tietoa apolipoproteiinien ApoA1 ja ApoB pitoisuuksista ja säilyvyydestä. Tietoa voidaan käyttää hyväksi tulevissa Metropolian biokemian opintokokonaisuuksissa. Koulu voi esimerkiksi käyttää plasma- tai seeruminäytteitä opetuksessa ja saada opinnäytetyön avulla tietoa siitä, kuinka kauan plasma tai seerumi säilyy käyttökelpoisena näyttemateriaalina apolipoproteiinitutkimuksissa. Tämän perusteella voidaan pohtia esimerkiksi saatujen tulosten luotettavuutta.

Tavoitteenamme opinnäytetyössä on saada vastaus kahteen tärkeimpään tutkimusaiheeseen liittyvään kysymykseen:

1. Onko seerumista ja plasmasta mitatuissa ApoA1 ja ApoB pitoisuuksissa tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta?
2. Onko näytteiden säilytysajalla tilastollista merkittävyyttä plasman ja seerumin ApoA1 ja ApoB pitoisuuteen?

Asetimme nollahypoteesit molemmille tutkimuskysymyksillemme. Oletamme, että seerumin ja plasman välisissä ApoA1 ja ApoB pitoisuuksissa ei ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. Toisen tutkimuskysymyksemme nollahypoteesi on, että näytteiden säilytysajalla ei ole tilastollista merkittävyyttä plasman ja seerumin ApoA1 ja ApoB pitoisuuteen.

3 Lipoproteiinit ja apolipoproteiinit

Lipoproteiinien tarkoituksena on saada kuljetettua hydrofobisia molekyylejä veren vesipitoisessa ympäristössä. Lipoproteiini koostuu useista komponenteista. Sitä ympäröi fosfolipidien ja proteiinien kerros ja sen ydin koostuu kolesteroliesteristä ja triglyseridistä. Lipoproteiinit kuljettavat lipidejä niiden tuotantopaikoilta kudoksiin, joissa niillä on useita erilaisia tehtäviä. Ne osallistuvat esimerkiksi energian tuotantoon, varastointiin, hormonisynteesiin ja kalvomateriaalien muodostamiseen. (Marcovina — Packard 2006.)

Plasman lipoproteiinipartikkelit jaetaan luokkiin muun muassa kokonsa, tiheydensä sekä metabolisten tehtävien mukaan. Näistä tärkeimpiä ovat kylomikronit, VLDL- (very-low-density lipoprotein), IDL- (intermediate density lipoprotein), LDL- (low-density lipoprotein) ja HDL- (high-density lipoprotein) partikkelit. Kylomikronit ovat kooltaan suurimpia, mutta vähiten tiheitä partikkeleita, kun taas HDL-partikkelit ovat pienimpiä, mutta tiheimpiä partikkeleita. (Mahley — Innerarity — Rall — Weisgraber 1984.)

Lipoproteiinien proteiiniosia kutsutaan apolipoproteiineiksi. Niiden tärkeimmät tehtävät ovat vaikuttaa lipoproteiinien aineenvaihduntaan ja kuljetukseen. Ne ylläpitävät lipoproteiinien rakennetta ja ovat tärkeässä roolissa lipidimetabolian entsyymien aktivoinnissa ja estämisessä. Vesiliukoisessa ympäristössä lipoproteiinit käyvät läpi uudistumisprosessin, jonka avulla niiden sisältö voidaan kuljettaa eri kudosten ja lipoproteiiniluokkien välillä. Mikäli uudistumisprosessissa on jotakin vialla, se voi viitata erilaisiin sairauksiin. (Marques — Diniz — Antunes — Rossi — Caperuto — Lira — Conclaves 2018.)

3.1 Apolipoproteiini A1

Rasvat, kuten esimerkiksi kolesteroli, kulkeutuvat elimistössä lipoproteiinipartikkeleissa. Yksi näistä partikkeleista on HDL, jonka tärkeimpiin rakenneproteiineihin kuuluu ApoA1

eli apolipoproteiini A1 (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2011). Ne muodostuvat pääasiallisesti maksassa ja poiketen suuremmista lipoproteiinipartikkeleista ne eivät kuljeta lipidejä soluihin, vaan osallistuvat liiallisten lipidien poistamiseen soluista. HDL sisältää n. 80 erilaista proteiinia, joista noin kolmasosa osallistuu lipidien kuljettamiseen. HDL proteiineista n. 70 % koostuu ApoA1:stä. HDL osallistuu muun muassa käänteiseen kolesterolin kuljetukseen, jossa ApoA1 on merkittävästi osallisena. (Chistiakov — Orekhov — Bobryshev 2016.)

Käänteisessä kolesterolin kuljetuksessa kolesterolia poistetaan perifeerisestä kudoksesta ja kuljetetaan maksaan, jossa se jaetaan uudestaan muihin kudoksiin tai poistetaan kehosta sappirakon kautta. Suolistossa ja maksassa syntetisoitu ApoA1 siirtyy ensiksi verenkiertoon, josta se kulkeutuu esimerkiksi sydämen perifeerisiin kudoksiin. ApoA1 on suonissa ja valtimoissa vuorovaikutuksessa eri solutyypin reseptorien kanssa, joita kutsutaan ATP:tä sitovaksi kasetiksi. Vuorovaikutus saa makrofaagien kolesterolit ja fosfolipidit liikkumaan kohti ApoA1:tä, josta muodostuu lopulta HDL-kolesteroli. (Marques ym. 2018.) Valtimosairauksien vaaran pieneneminen on yhdistetty monissa tutkimuksissa suureen HDL-kolesteroli pitoisuuteen, kun taas pieni HDL-kolesterolin pitoisuus on suurentanut vaaraa. Sukupuoli, liikunnan määrä, perimä ja lihavuus kuuluvat tekijöihin, jotka vaikuttavat HDL-kolesterolin määrään kehossa. (Eskelinen 2016A.)

3.2 Apolipoproteiini B

Toinen kehomme tärkeistä lipoproteiinipartikkeleista on LDL eli low-density lipoprotein. LDL-partikkeleita syntyy lopputuotteena, kun lipoproteiinilipaasi-entsyymi hydrolysoi VLDL-partikkeleita vapaiksi rasvahapoiksi. LDL-partikkelit sisältävät paljon kolesterolia ja on tärkein kolesterolia kuljettavista lipoproteiinipartikkeleista. LDL-partikkelien tehtävänä on kuljettaa triglyseridejä ja kolesterolia maksasta kehon eri kudoksiin. (Mahley ym. 1984.) Kolesterolia kulkeutuu myös valtimoiden seinämiin. Koska LDL-kolesterolin määrä kuvastaa hyvin kudoksiin kertyneen kolesterolin määrää, kuvastaa LDL-kolesterolin määrä hyvin esimerkiksi valtimokovettumataudin riskiä. Tästä syystä LDL-kolesterolia on saanut lempinimen "paha kolesteroli". (Eskelinen 2016B.)

Apolipoproteiini B on tärkein LDL-partikkelien proteiineista. Noin 90 % plasman ApoB:stä esiintyy LDL-partikkeleissa. ApoB:stä on kaksi muotoa, ApoB-100, jota syntetisoituu

maksassa ja apoB-48, jota syntetisoituu suolistossa. LDL-partikkeleissa sekä pienemmissä määrin myös VLDL- ja IDL-partikkeleissa ApoB esiintyy apoB-100 muodossa, kun taas muotoa apoB-48 esiintyy vain kylomikroneissa. (Mahley ym. 1984.) Mittaamalla ApoB:n pitoisuutta verestä, saadan arviota myös LDL-partikkelien lukumäärästä. Mittaamalla ApoB:n pitoisuutta LDL-kolesterolin ohella, saadaan lisätietoa esimerkiksi sydän- ja verisuonitautien riskistä tai lääkehoidon toimivuudesta, erityisesti riskiryhmien, kuten diabeetikoiden ja ylipainoisten kohdalla. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2011.)

4 Apolipoproteiinien määrittäminen

Apolipoproteiinien A1 ja B määrittäminen verestä immunoturbidimetrisellä menetelmällä kuuluu kliinisen kemian osa-alueeseen. Kuten muutkin kliinisen kemian tutkimukset, kulkee apolipoproteiinien tutkimusprosessi preanalytiikasta analytiikan läpi aina postanalytiikkaan. Tällä välillä tapahtuu kaikki tutkimustulokseen vaikuttavat tekijät, kuten ohjeen mukainen näytteenotto, näytteen säilytys sekä sen käsittely.

4.1 Preanalytiikka

Preanalyttinen vaihe on laboratoriotutkimusprosessin ensimmäinen vaihe. Vaihe pitää sisällään kaikki hetket laboratoriotutkimuksen tarpeen toteamisesta aina näytteen valmisteluun analyysikelpoiseksi. Preanalytiikka on tärkeä osa laboratoriotutkimuksen luotettavuutta. Kokonaisuudessaan kliinisen laboratorion virheistä 46–68,2 % syntyy preanalyttisessä vaiheessa. Virheitä syntyy tutkimuspyyntöjä tehdessä, potilaiden ohjauksessa tai valmistautumisessa, näytteiden otossa sekä niiden kuljetuksessa ja säilytyksessä. (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 7–8.)

Potilaan ohjauksella ja valmistautumisella on vaikutusta tutkimuksen onnistumiseen ja luotettavuuteen. Potilaan oikea ohjaus ja valmistautuminen vakioi ja minimoi potilaan omaan toimintaan liittyvien tekijöiden vaikutusta tuloksiin. Potilasta voidaan esimerkiksi pyytää rajoittamaan fyysistä ja psyykkistä rasitusta, lääkkeiden ottamista, alkoholin käyttöä ja tupakointia. Muita tulokseen vaikuttavia tekijöitä voivat olla näytteenoton ajankohta sekä asiakkaan asento näytteenottotilanteessa. (Matikainen – Miettinen – Wasström 2016: 12, 18; Tuokko ym. 2008: 9)

Potilasta voidaan myös pyytää paastoamaan eli rajoittamaan ateriointia ja nesteiden nauttimista. Paastossa potilas on syömättä ja juomatta kello 20:stä eteenpäin näytteenottoon asti eli noin 10–12 tuntia. Potilas voi juoda aamulla ennen näytteenottoa korkeintaan kaksi desilitraa vettä, mutta kahvin sekä kola- ja energiajuomien juominen on kiellettyä. Ennen näytteenottoa nautittu ravinto voi vaikuttaa esimerkiksi veren rasva-, proteiini-, glukoosi-, vitamiini- ja hivenainepitoisuuksiin. (Matikainen – Miettinen – Wasström 2016: 18–20.)

Veren triglyseridipitoisuus on kolme tuntia ruokailun jälkeen otetuissa näytteissä noin 25 prosenttia korkeampi kuin paastonäytteissä. Toisaalta yli kahden vuorokauden paasto voisi myös nostaa triglyseridipitoisuutta. Myös runsaalla proteiinipitoisella ravinnolla voi olla vaikutus kolesterolimääritysten tuloksiin vielä 12 tuntia paaston jälkeen. Alkoholilla nostaa plasman triglyseridi ja HDL-kolesterolipitoisuuksia. Myös tupakointi nostaa veren kolesteroli- ja lipoproteiinipitoisuuksia. (Matikainen – Miettinen – Wasström 2016: 21; Tuokko ym. 2008: 22.)

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorion tutkimusohjekirjan mukaan apolipoproteiinien A1 ja B tutkimuksissa käytetään seerumia. Seeruminäyte säilyy jääkaapissa kolme vuorokautta ja kaksi kuukautta pakastettuna (-20°C). Ohjeen mukaan näytteen voi lähettää huoneenlämpöisenä, jos se on perillä yhden vuorokauden kuluessa. Tämän perusteella voidaan siis olettaa näytteen säilyvän huoneenlämmössä vähintään yhden vuorokauden. Tutkimus ei vaadi paastoa, mutta se on suositeltavaa. (HUSLAB 2020.)

4.2 Plasma ja seerumi

Kun tutkitaan verinäytteitä, voidaan näytteenä käyttää kokoverta, plasmaa tai seerumia. Veren plasma on kellertävää nestettä ja sen osuus koko verestä on noin 55 prosenttia. Plasma sisältää veteen liuenneita komponentteja, kuten suoloja ja proteiineja. Näiden lisäksi se sisältää ravintotekijöitä kuten rasvahappoja, aminohappoja ja glukoosia. Plasma sisältää myös hormoneja ja vasta-aineita. Plasma kuljettaa puna- ja valkosoluja sekä trombosyyttejä eli verihiutaleita verenkierrossa. (Tuokko ym. 2008: 35).

Kun näytteenä on kokoveri tai plasma, otetaan verinäyte hyytymisen estäjää eli anti-koagulanttia sisältävään näyteputkeen. Käytettävä hyytymisenestoaine riippuu tehtävästä tutkimuksesta. Erilaisia hyytymisenestoina ovat esimerkiksi hepariini, EDTA eli etyleenidiamiinotetraetikkahappo, natriumsitraatti ja natriumfluoridi. Opinnäytetyösämme käytimme litium-hepariiniputkia. Hepariini estää fibrinin muodostumista, täten myös veren hyytymisen. Hepariinia on ihmiskehossa luonnostaan. Se ei hajota eli hemolysoi punasoluja eikä sillä ole vaikutusta näytteen pH-arvoon. (Matikainen – Miettinen – Wasström 2016: 78.)

Jos näytteeksi halutaan seerumia, näyteputkeen otetun veren annetaan hyytyä. Putki ei siis sisällä antikoagulanttia vaan putki on joko lisäaineeton tai se sisältää hyytymistä nopeuttavaa hyytymisaktivaattoria. Seeruminäytteen tulee antaa hyytyä noin 15–30 minuuttia ennen sentrifugointia. Kun seeruminäyte sentrifugoidaan, fibrinistä ja verisoluista muodostunut hyytymä painuu putken pohjaan ja sen päälle nousee seerumikerros. (Matikainen – Miettinen – Wasström 2016: 78, 81.)

Kliinisen kemian tutkimuksissa on aiemmin käytetty pääasiassa seerumia, mutta plasman käyttö on yleistynyt automaation myötä tulleen paremman soveltuvuuden takia. Plasmanäytteet saadaan nopeammin analysoitavaksi, koska niitä käytettäessä ei tarvitse odottaa veren hyytymistä. Lisäksi kokoverinäytteestä saadaan plasmaa noin 15–20 prosenttia enemmän kuin seerumia. (Tapola 2004.)

4.3 Analytiikka ja analyysimenetelmä

Käytimme näytteiden analysoinnissa koulumme biokemian luokassa olevaa Thermo Scientificin Indiko Plus analysaattoria. Thermo Scientific Indiko Plus on täysautomaattinen, random-access -periaatteella toimiva analysaattori, joka on tarkoitettu kliinisen- ja erikoiskemian tutkimuksille. Näihin lukeutuu muun muassa entsyymien, substraattien, elektrolyyttien, spesifisten proteiinien sekä terapeuttisten-, väärinkäytettyjen- ja immunosuppressiivisten lääkkeiden tutkimukset. Analysaattorilla voidaan suorittaa monia erilaisia testejä yhdestä näytteestä samanaikaisesti. Analysaattorissa on myös ionispesifinen elektrodikompleksi (ISE) -mittausyksikkö natrium-, kalium- ja kloridimittauksille. (Thermo Scientific 2018.)

Apolipoproteiini A1 ja Apolipoproteiini B pitoisuudet analysoidaan käyttämällä suoraa immunoturbidometristä menetelmää. Puskuroituihin näytteisiin lisätään ylimäärin spesifistä antiseerumia, jolloin immunokomplekseja muodostuu analyysin ja spesifin vasta-aineen välille. Tästä syntyvää absorbanssin kasvua mitataan reaktion loppupisteessä aallonpituudella 340nm. Antigeenin määrä on verrannollinen absorbanssin muutokseen, jonka avulla tulos lopulta saadaan. (Riistama-Laari – Kurki – Määttä – Tikanoja – Lampinen 2014.)

4.4 Postanalytiikka

Laboratoriotutkimusprosessin postanalyttisessä vaiheessa arvioidaan tutkimuksen tulosten luotettavuutta. Tämän tekee laboratorio, jonka jälkeen laboratorio ilmoittaa tulokset lääkärille tai hoitoyksikölle. Tämän jälkeen lääkäri arvioi laboratoriotulosta ja sitä mitä se kertoo potilaan terveydentilasta. Lisäksi postanalytiikkaan sisältyy tulosten arkistointi sekä näytteiden/näytevalmisteiden säilöminen. (Matikainen – Miettinen – Wasström 2016: 47.)

4.5 Verinäytteiden säilyvyys

Jokaisella näytteellä voi olla eri säilöntätapa ja säilyvyys. Jokaisen laboratorion tutkimustietokannasta, ohjekirjoista ja verkkosivuilta löytyy ohjeet näytteiden säilöntään. Näytteitä toimitetaan Suomessa laboratoriosta toiseen sairaanhoitopiirin sisällä ja myös sen ulkopuolelle. Näytteitä lähetetään tutkittavaksi myös Suomen rajojen ulkopuolelle. Näytteet tulee toimittaa tutkivaan laboratorioon mahdollisimman pian, sillä jotkut näytteistä voi edellyttää nopeaa esikäsittelyä tai analysointia. (Tuokko ym. 2008: 114.)

5 Aikaisempia tutkimuksia

Opinnäytetyömme tueksi etsimme taustatietoa ja aikaisempia tutkimuksia. Aikaisempia tutkimuksia löytyi apolipoproteiinien ja niiden säilyvyyteen sekä yleisesti kliinisen kemian tutkimuksiin liittyen. Näitä tutkimuksia käytettiin oman työmme vertailukohteena.

5.1 Apolipoproteiinien A1 ja B immunoturbidometrinen määrittäminen seerumista

Vuonna 1987 Riepponen, Marniemi ja Rautaoja tutkivat apolipoproteiinien A1 ja B immunoturbidometrinen määrittäminen seerumista. Immunoturbidometrisen menetelmän ja aikaisemmin käytetyn radiaalisen immunodiffusiomenetelmän tulosten korrelaatiota käytettiin määrittämään immunoturbidometrisen menetelmän luotettavuutta. Lisäksi tutkittiin säilytyksen sekä pakastamisen ja sulattamisen vaikutuksia näyteisiin.

Tutkimuksen mukaan immunoturbidometrinen menetelmä korreloi hyvin radiaalisen immunodiffusiomenetelmän kanssa ($r = 0,96$). Immunoturbidometrinen määrittäminen on helppo suorittaa ja se sopii hyvin kliinisiin rutiinimäärittämiin ja epidemiologisiin tutkimuksiin. Se on helposti mukautettavissa suurimpaan osaan kliinisen kemian analysointireiteistä.

Taulukko 1. Säilyvyyttutkimuksen tuloksia (Riepponen – Marniemi – Rautaoja 1987. Kuvakaappaus.)

TABLE I. Stability of native patient sera in a refrigerator at +4 °C up to 4 weeks. Numbers 1–6 are examples of 36 analysed specimens

Serum number	Fresh	1 week	2 weeks	4 weeks
(a) Apo A-1 (g/l)				
1	1.07	1.12	1.10	1.14
2	1.55	1.53	1.55	1.55
3	1.60	1.69	1.64	1.74
4	2.00	2.02	1.98	2.08
5	1.12	1.18	1.15	1.05
6	2.19	2.25	2.21	2.35
Mean	1.49	1.56	1.56	1.62
(b) Apo B (g/l)				
1	0.60	0.63	0.60	0.63
2	1.16	1.20	1.17	1.16
3	0.93	0.90	0.87	0.90
4	0.90	0.92	0.87	0.93
5	2.40	2.44	2.54	2.46
6	0.59	0.51	0.57	0.48
Mean	1.30	1.32	1.31	1.30

Mean is the average of all 36 analysed specimens.

Säilyvyyttä tutkittiin 36:sta seeruminäytteestä, joita oli säilytetty 4°C asteessa. Mittaukset tehtiin tuoreista sekä yksi, kaksi ja neljä viikkoa jääkaapissa olleista säilöntäaineettomista seeruminäytteistä. Tutkimuksen mukaan apolipoproteiini B säilyi stabiilina neljän viikon ajan, mutta apolipoproteiini A1 tulos nousi lähes 10 prosenttia tänä aikana. Pakastus-sulatus-tutkimuksessa näytteet pakastettiin ja sulatettiin yhteensä 5 kertaa. Toistuvalla pakastamisella ja sulattamisella oli vahingoittava vaikutus näytteisiin, etenkin apolipoproteiini B:hen, pienentäen sen tulosta. Näistä syistä tutkimuksessa suositellaan tuoreen seeruminäytteen käyttöä. (Riepponen – Marniemi – Rautaoja 1987.)

5.2 24:n analyytin säilyvyystutkimus plasmasta ja seerumista

Vuonna 2002 Boyanton Jr. ja Blick tutkivat 24:n analyytin säilyvyyttä plasma ja seeruminäytteistä (mukaan lukien fP-Kol ja fP-Trigly). Tutkimuksessa tutkittiin pitkittynyttä seerumin ja plasman kontaktia punasoluihin ja sekä välittömän erottelun vaikutusta. Näytteet kerättiin kymmeneltä vapaaehtoiselta osallistujalta. Kaikkia näytteitä säilytettiin huoneenlämmössä. Ensin näytteet analysoitiin puoli tuntia näytteenoton jälkeen. Tämän jälkeen seuraavan 4–56 tunnin aikana näytteet analysoitiin vielä 8 kertaa. Ensimmäisen analysointikerran tuloksien keskiarvoa verrattiin muihin mittauksiin varianssianalyysin eli ANOVA:n avulla.

Tutkimuksen mukaan plasman/seerumin ja punasolujen pitkäaikaisella kontaktilla on kliinisesti merkittävä vaikutus näytteissä tapahtuviin muutoksiin. Merkittäviä muutoksia oli 15:sta analyytissä 24:stä. Merkittävimpiä muutoksia tapahtui esimerkiksi kaliumin, glukosin, kreatiinin ja laktaatin konsentraatioissa. Myös kokonaiskolesteteroli nousi ajan myötä. Muutokset olivat huomattavampia plasmanäytteissä. Tämän takia seerumin käyttö olisi suositeltavaa, jos punasolukontakti tulee olemaan pitkä. Muutokset olivat merkittävimpiä näytteissä, joita oli säilötty pidempään kuin 24 tuntia. Sen sijaan kaikki näytteet, jotka eroteltiin välittömästi, pysyivät stabiileina koko tutkimuksen ajan. (Boyanton – Blick 2002.)

5.3 Kemiallisten ja immunokemiallisten analyyttien säilyvyystutkimus

Vuonna 2008 Leino ja Koivula tutkivat kemiallisten ja immunokemiallisten analyyttien konsentraatioiden säilyvyyttä kokoveressä. Tutkimuksessa mitattiin yhteensä 41 analyytia (mukaan lukien fP-Kol ja fP-Kol-HDL), joista 26 oli kemiallisia näytteitä ja 15 immunokemiallisia näytteitä. Näytteet kerättiin 50:ltä paastoa noudattaneelta vapaaehtoiselta. Yksi näyte eroteltiin välittömästi (0,5 tunnin sisään) ja toimi näin nollanäytteenä. Kahta muuta näytettä säilytettiin kokoverenä 6 tuntia; toista 22°C ja toista 8°C asteessa. Kuiden tunnin jälkeen näytteet eroteltiin välittömästi. Lisäksi tutkimuksessa tutkittiin kuljetuksen vaikutuksia.

Heti eroteltujen näytteiden eli nollanäytteiden tulosten keskiarvot laskettiin ja niitä verrattiin 6 tuntia kokoverenä säilytettyjen näytteiden tulosten keskiarvoihin. Tämänkin tutkimuksen tuloksia analysoitiin varianssianalyysin eli ANOVA:n avulla. Lisäksi kliinisesti

merkittävät muutokset määritettiin käyttäen SCL-kaavaa eli significant change limit kaavaa.

Tutkimuksen tulosten mukaan kaikki näytteet säilyivät hyvin, lukuun ottamatta P-Ka tutkimusta, jossa merkittäviä muutoksia tapahtui 8°C asteessa säilytyksessä näytteissä. Tutkimuksen lopuksi mainitaan, että kuuden tunnin säilytys 8°C tai 22°C asteessa kokoverenä on mahdollista, jos erottelua ei ole mahdollista tehdä. Kuitenkin kaliumnäyte on riippuvainen lämpötilasta eikä sitä voida tehdä kylmetetystä näytteestä. (Leino – Koivula 2008.)

6 Tutkimuksen toteutus

Opinnäytetyön analyysiosuus suoritettiin kahdessa osassa. Käyttämämme analyysimenetelmät jakautuivat keräämiemme näytteiden kemialliseen analysoimiseen ja näytteistä saadun aineiston analysoimiseen taulukkolaskentaohjelmalla. Näytteiden kemiallisen analysoinnin suoritimme Metropolia Ammattikorkeakoulun biokemian laboratorion Indiko Plus analysaattorilla. Tilastollinen analyysi suoritettiin käyttäen Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmaa.

6.1 Näytteiden käsittely

Näytteiden mittausprosessi suoritettiin kokonaisuudessaan Metropolian Myllypuron kampuksella. Mittausprosessi alkoi 07.12.2020 näytteenotolla näytteenottoluokassa Myllypurossa. Koronaviruspandemiasta ja rajoituksista johtuen vapaaehtoisia oli vain vähän. Tutkimukseen osallistui yhteensä 6 vapaaehtoista. Lisäksi otimme näytteitä myös toisiltamme. Jokaiselta otettiin 2–3 putkea seerumiverta ja 2–3 putkea litium-hepariiniverta. Putkien koko vaihteli 3–10 ml välillä ja osa putkista oli erottelugeeliä sisältäviä putkia. Yhteensä näytteitä otettiin 44 kappaletta; 22 seerumiputkea ja 22 litium-hepariini-putkea. Näytteenoton jälkeen näytteet numeroitiin numeroilla 1–22. Jokainen vapaaehtoinen allekirjoitti näytteenoton jälkeen suostumussopimuksen.

Näytteenoton jälkeen näytteitä seisotettiin vähintään 30 minuuttia, koska seerumiputkien täytyy antaa hyytyä. Näytteiden seisotuksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin biokemianluokan sentrifugilla 2000 g:ssä 10 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen jokaisen näytteen plasma/seerumi jaettiin kolmeen eppendorf-putkeen; ensimmäinen putki tuoretta analyysia varten, toinen putki 3 päivää jääkaapissa (4°C) olleen näytteen analyysia varten sekä kolmannesta putkesta 3 kuukautta pakastimessa (-20°C) olleen näytteen analyysia varten. Jokaiseen putkeen kirjattiin näytteen numero sekä näyttemateriaali (plasma/seerumi).

Analysaattorin valmistelussa tarkastimme ApoA1- ja ApoB-tutkimuksissa käytettävien vakioiden, kontrollien sekä reagenssien LOT- ja Ref-tiedot sekä niiden voimassaolon Indiko Plus analysaattorin käyttöohjelman tiedoista. Tiedot muutettiin tarvittaessa. Analyysissä käytettiin vain voimassa olevia reagensseja ja tarvikkeita. ApoA1- ja ApoB-tutkimusten kalibroinnit olivat voimassa olevia, joten kalibraatioita ei tarvinnut suorittaa. Laimensimme Lipotrol-kontrollin ohjeiden mukaan lisäämällä 3 millilitraa aquaa ja seisottamalla 30 minuuttia. Tämän jälkeen ajoimme kontrollin tutkimuksille. Kontrollien ajossa tulokset olivat kontrollille asetettujen tavoiterajojen sisällä eikä käyttöohjelma valittanut virheistä, joten kontrollien ajo meni läpi hyväksytysti.

Jokainen näyte analysoitiin 2 kertaa, jotta voisimme verrata rinnakkaismittauksen tuloksia toisiinsa. Kaikki tulokset tulostettiin ja ne siirrettiin käsiteltäviksi Microsoft Excel-taulukko-ohjelmaan.

6.2 Tulosten analysointi

Asettelimme taulukkoon keräämämme aineiston 22 näytteestä, joista kustakin teimme kaksi kappaletta mittauksia ApoA1 ja ApoB seerumille sekä plasmalle. Näistä arvoista mittasimme jokaisen rinnakkaismittauksen keskiarvon. Keskiarvon saimme laskemalla yhteen lukujen summan ja jakamalla summan lukujen määrällä. Luotuumme keskiarvo-taulukon teimme ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman sekä ApoB seerumin ja ApoB plasman keskiarvoille yksisuuntaisen varianssianalyysin. Yksisuuntaisen varianssianalyysin suorittamiseen valitsimme f-testin. Testin suorittaminen tapahtui käyttämällä erillistä Microsoft Excel analyysityökalua, johon syötettiin kahden vertailtavan joukon keskiarvot. F-testillä pyritään selvittämään, ovatko kahden vertailussa olevien keskiarvojoukkojen varianssit yhtä suuria. Oletuksena eli nollahypoteesina on, että varianssit ovat yhtä suuria.

Varianssi määritellään sen mukaan, kuinka lähelle jakauman keskikohtaa käytetyt arvot asettuvat. Kun keskiarvoa käytetään jakauman keskipisteenä, varianssi määritellään käytettyjen arvojen keskimääräiseksi neliöeroksi keskiarvosta. (Lane 2003.) Varianssin esimerkiksi ollessa pieni, muuttujien arvot keskittyvät tiiviisti keskiarvon ympärille.

F-testin jälkeen suoritimme kahden riippumattoman otoksen t-testin, jossa vertailimme ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman sekä ApoB seerumin ja ApoB plasman keskiarvojen erotuksen tilastollista merkittävyyttä. T-testi on tilastollinen menetelmä, jonka avulla voidaan vertailla kahden joukon keskiarvoja (Kim 2015). T-testin matemaattisen kaavan valikoituminen määräytyi sen mukaan, minkä tuloksen olimme saaneet aikaisemmin tehdyssä f-testissä. Mikäli kahden joukon varianssit osoittautuvat yhtä suuriksi, käytettäväksi valikoituu kaava, joka olettaa varianssit yhtä suuriksi. Mikäli varianssit eivät taas ole yhtä suuret, käytetään kaavaa, joka olettaa varianssit eri suuriksi. (Kim 2015.) Nollahypoteesinamme t-testissä oli, että vertailtavien näytteiden pitoisuuseroilla ei ole tilastollista merkittävyyttä. T-testistä saimme ulos myös p-arvon, jonka avulla selvitimme sen, kuinka suurella todennäköisyydellä saatu tulos on selitettävissä otantavirheellä. Mitä pienempi p-arvo on, sitä suuremmalla todennäköisyydellä nollahypoteesi ei pidä paikkaansa. P-arvon tuloksen ollessa yli 0.050 ($p > 0.050$), tuloksilla ei oleteta olevan tilastollista merkittävyyttä. (Lane 2003.)

Kaikki edellä mainitut testit suoritettiin tuorenäytteille, kolme vuorokautta jääkaapissa säilytetyille näytteille ja kolme kuukautta pakastimessa säilytetyille näytteille. Ensiksi suoritimme vertailun samanaikaisesti otettujen näytteiden sisällä eli esimerkiksi tuorenäytteiden ApoA1 seerumia verrattiin ApoA1 plasmaan ja ApoB seerumia verrattiin ApoB plasmaan. Tämän lisäksi vertailimme tuorenäytteiden jokaista yksittäistä analyyyttia jääkaapissa säilytettyihin ja pakastimessa säilytettyihin vastaaviin näytteisiin t-testiä käyttäen. Esimerkiksi tuorenäytteestä tehtyä ApoA1 seerumia verrattiin jääkaapissa säilytettyyn ApoA1 seerumiin ja tuorenäytteestä tehtyä ApoB plasmaa verrattiin pakastimessa säilytettyyn ApoB plasmaan.

Tuorenäytteiden vertailussa jätimme näytteet 11 ja 12 pois laskuista manuaalisen virheen seurauksesta syntyneen puuttuvan rinnakkais mittauksen vuoksi. Tästä syystä havaintojen lukumäärä tuorenäytteiden vertailussa on 20 näytettä 22:n sijasta. Jääkaapissa säilytettyjen ja pakastimessa säilytettyjen näytteiden kohdalla suoritimme analysoinnin käyttäen kaikkia 22 näytettä, sillä tällä ei ollut tutkimuksemme lopputulokseen vaikutta-

vaa vaikutusta. Tuorenäytteiden, jääkaappisäilytettyjen näytteiden ja pakastimessa säilytettyjen näytteiden välisessä vertailussa jätimme pois näytteet 11 ja 12, jotta vertailtavien muuttujien lukumäärä olisi sama.

6.3 Tiedonhaku

Tutkimuksen tuloksissa käytetty aineisto on kerätty tekemällä mittauksia Metropolia ammattikorkeakoulun biokemian luokassa. Tämän lisäksi aineistoa kerättiin hakemalla tietoa eri tieteellisistä tietokannoista, käyttämällä tutkimukseemme liittyviä avainsanoja. Tietokantoja, joihin teimme hakuja, olivat esimerkiksi Pubmed, Ovid Medline, Google Scholar ja Medic. Käytimme lähdemateriaalina myös kirjastosta lainattuja painettuja teoksia.

6.4 Suostumusasiakirjan laatiminen

Opinnäytetyön toteutusta varten laadimme Microsoft Word ohjelmalla suostumusasiakirjan (Liite 1), johon keräsimme suostumuksen jokaiselta tutkimukseemme näyttemateriaalia luovuttaneelta henkilöltä. Asiakirjasta käy ilmi, mihin näytteitä tullaan käyttämään ja varmistetaan, että osallistuva henkilö on tietoinen siitä, mihin tutkimukseen hän on osallistumassa. Asiakirjasta käy ilmi myös tutkimukseen osallistumisen vapaaehtoisuus sekä kerättyjen tietojen luottamuksellinen käsittely. Asiakirjaan kerätään osallistujan, opinnäytetyöntekijän sekä opinnäytetyön vastaavan henkilön allekirjoitus.

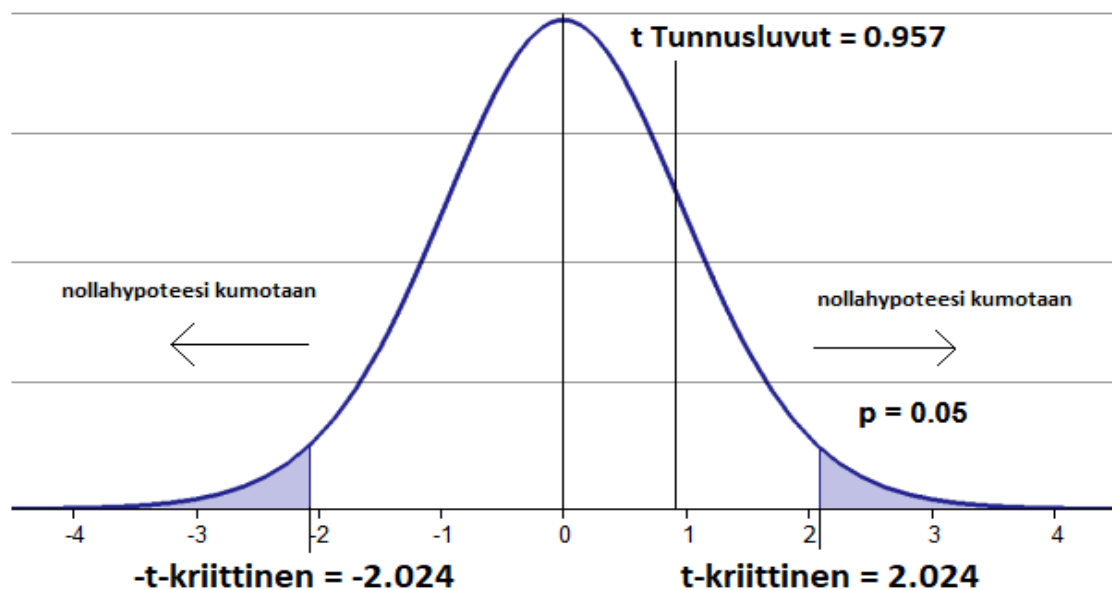
7 Tulokset

Ensimmäisellä tutkimuskysymyksellämme pyrimme selvittämään, onko seerumin ja plasman antamissa ApoA1 ja ApoB pitoisuuksissa tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. Ensiksi teimme ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman sekä ApoB seerumin ja ApoB plasman välisen t-testin tuorenäytteistä. ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasma tuorenäytevertailun f-testiä tarkastellessa (Taulukko 2) katsotaan F ja F-kriittinen yksisuuntainen arvoja. Excel laskee F arvon jakamalla ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman varianssit. F arvon ollessa pienempi, kuin F-kriittinen yksisuuntainen arvo voidaan olettaa, että nollahypoteesi pätee. Tarkastelemiemme muuttujien kohdalla $F = 1.451$ ja F-kriittinen yksisuuntainen = 2.168. Näin ollen $F < F\text{-kriittinen yksisuuntainen}$, joten voimme päätellä, että nollahypoteesi pätee. Voimme siis olettaa varianssit tilastollisesti yhtä suuriksi.

Taulukko 2. F-testin tulokset ApoA1 seerumille ja ApoA1 plasmalle tuorenäytteestä.

	<i>ApoA1 plasma (g/l)</i>	<i>ApoA1 seerumi (g/l)</i>
Keskiarvo	1.60425	1.643
Varianssi	0.019400724	0.013366842
Havainnot	20	20
va	19	19
F	1.451406662	
P(F<=f) yksisuuntainen	0.212133295	
F-kriittinen yksisuuntainen	2.168251601	

Tullessamme johtopäätökseen, että nollahypoteesi pätee f-testissä, suoritimme samoille muuttujille kahden otoksen t-testin olettaen varianssit yhtä suuriksi (Taulukko 3). Käytämme tarkastelussa kaksisuuntaisia (t-kriittinen kaksisuuntainen) arvoja, sillä tarkastelemme testissä saamaamme tulosta kahteen suuntaan. Mitä lähempänä arvoa 0, t Tunnusluvut sarakkeen arvo on, sitä todennäköisemmin tilastollista merkittävyyttä ei ole havaittavissa ja sitä yleisempi saatu arvo on. T-kriittinen kaksisuuntainen- arvoa tarkastelemme sekä positiivisena että negatiivisena lukuna, jolloin se muodostaa rajat hypoteesillemmolempiin suuntiin. Mikäli raja ylitetään tai alitetaan, voidaan puhua tilastollisesti merkittävästä tuloksesta ja nollahypoteesi kumotaan. Rajat olemme määrittäneet asettamalla merkittävyytasoksi 0.05. Voimme kumota siis nollahypoteesin, jos t Tunnusluvut < -t-kriittinen kaksisuuntainen tai t Tunnusluvut > t-kriittinen kaksisuuntainen. Mittaustemme perusteella t Tunnusluvut = 0.957 ja t-kriittinen kaksisuuntainen = 2.024 (Kuvio 1).



Kuvio 1. Kaaviokuva t-testistä.

Näin ollen t Tunnusluvut > -t-kriittinen kaksisuuntainen ja t Tunnusluvut < t-kriittinen kaksisuuntainen. Tämän perusteella nollahypoteesi pätee eli ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroa tuorenäytteessä. Tuloksen sattumanvaraisuutta arvioimme tarkastelemalla $p(T \leq t)$ kaksisuuntainen- arvoa eli p-arvoa. P-arvon ollessa alle 0.05 voidaan tuloksella olettaa olevan tilastollisesti merkittävä ero. Muuttujiemme kohdalla p-arvo = 0.344, joten tulos tukee nollahypoteesin paikkansapitävyyttä.

Taulukko 3. T-testin tulokset ApoA1 seerumille ja ApoA1 plasmalle tuorenäytteestä

	<i>ApoA1 seerumi (g/l)</i>	<i>ApoA1 plasma (g/l)</i>
Keskiarvo	1.643	1.60425
Varianssi	0.013366842	0.019400724
Havainnot	20	20
Yhdistetty varianssi	0.016383783	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	38	
t Tunnusluvut	0.957336494	
P(T<=t) yksisuuntainen	0.172224447	
t-kriittinen yksisuuntainen	1.68595446	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0.344448893	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2.024394164	

Vertailimme tuorenäytteen sisällä myös ApoB seerumia ja ApoB plasmaa. Myös näiden muuttujien välillä f-testin nollahypoteesi pysyi voimassa, sillä $F = 1.733$ ja F-kriittinen yksisuuntainen = 2.168 eli $F < F$ -kriittinen yksisuuntainen. Tämän perusteella voimme siis olettaa, että molempien joukkojen varianssit ovat tilastollisesti yhtä suuria. Nollahypoteesin pysyttyä voimassa, suoritimme kahden otoksen t-testin olettaen varianssit yhtä suuriksi. Tuloksena saimme, että t Tunnusluvut = 1.242 ja t-kriittinen kaksisuuntainen = 2.024. Näin ollen t Tunnusluvut > -t-kriittinen kaksisuuntainen ja t Tunnusluvut < t-kriittinen kaksisuuntainen eli nollahypoteesi pysyy voimassa. P-arvoksi saimme 0.221 eli $p > 0.05$. Tämä tukee nollahypoteesiamme, joten voimme olettaa, että ApoB seerumin ja ApoB plasman välisessä vertailussa ei ole myöskään tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta tuorenäytteestä tehdyssä mittauksessa.

Seuraavaksi vertailimme samalla tavalla jääkaapissa kolme vuorokautta säilytettyjä näytteitä. F-testin avulla selvitimme, että nollahypoteesi pysyy voimassa ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman välisessä vertailussa. Teimme analyysille kahden otoksen t-testin olettaen varianssit yhtä suuriksi. Tämän testin tuloksena saimme t Tunnusluvut =

0.856 ja t-kriittinen kaksisuuntainen 2.018. Näin ollen nollahypoteesi pätee ja voidaan todeta, että jääkaapissa säilytettyjen ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman pitoisuuksilla välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. P-arvo = 0.396, joten arvo tukee nollahypoteesiamme.

Vertailimme myös jääkaapissa säilytettyä ApoB seerumia ja ApoB plasmaa. F-testin tulos määritteli myös tässä tapauksessa varianssit tilastollisesti yhtä suuriksi. Teimme ApoB seerumin ja ApoB plasman välisen kahden otoksen t-testin olettaen varianssit yhtä suuriksi (Taulukko 4). T-testiä tarkastelemalla huomaamme, että t Tunnusluvut = 0.965 ja t-kriittinen kaksisuuntainen = 2.018. Tämän perusteella voimme todeta, että nollahypoteesimme pätee eli näiden kahden analyytin välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. Myös $p = 0.340$ tukee nollahypoteesiamme.

Taulukko 4. T-testin tulokset ApoB seerumille ja ApoB plasmalle jääkaapissa säilytetyistä näytteistä.

	<i>ApoB seerumi (g/l)</i>	<i>ApoB plasma (g/l)</i>
Keskiarvo	1.123863636	1.025454545
Varianssi	0.129742695	0.098959307
Havainnot	22	22
Yhdistetty varianssi	0.114351001	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	42	
t Tunnusluvut	0.965187251	
P(T<=t) yksisuuntainen	0.169987962	
t-kriittinen yksisuuntainen	1.681952357	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0.339975924	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2.018081703	

Suoritimme samat testit vielä pakastimessa kolme kuukautta (88 päivää) säilytetyille näytteille. ApoA1 seerumin ja ApoA1 plasman välisessä vertailussa f-testin tulos pysyi samana kuin edellisissä eli nollahypoteesi pätee. T-testissä saimme arvot t Tunnusluvut 1.868 ja t-kriittinen kaksisuuntainen 2.018. Myös t-testin kohdalla nollahypoteesi pätee. P-arvo = 0.069 tukee näidenkin analyyttien kohdalla nollahypoteesiamme.

Pakastettuna säilytettyjen ApoB seerumin ja ApoB plasman välisestä f-testistä saimme myös tulokseksi, että nollahypoteesi pätee. T-testissä saamamme arvot olivat kuitenkin poikkeavia edellisiin testeihin verrattuna (Taulukko 5). Huomaamme, että t Tunnusluvut = 2.460 ja t-kriittinen kaksisuuntainen = 2.0180. Tällöin t Tunnusluvut > -t-kriittinen kaksisuuntainen ja t Tunnusluvut > t-kriittinen kaksisuuntainen. Koska t Tunnusluvut > t-

kriittinen kaksisuuntainen, niin nollahypoteesi kumotaan. Myös $p=0.018$ eli $p<0.05$, joten tämän perusteella voidaan päätellä, että ApoB seerumin ja ApoB plasman pitoisuuksien välillä on tilastollisesti merkittävä eroavaisuus pakastimessa säilytettyjen näytteiden kohdalla.

Taulukko 5. T-testi ApoB seerumin ja ApoB plasman välillä pakastimessa säilytetyistä näytteistä

	<i>ApoB seerumi (g/l)</i>	<i>ApoB plasma (g/l)</i>
Keskiarvo	1.109545455	0.912954545
Varianssi	0.106692641	0.033751569
Havainnot	22	22
Yhdistetty varianssi	0.070222105	
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	42	
t Tunnusluvut	2.460497067	
P(T<=t) yksisuuntainen	0.009034669	
t-kriittinen yksisuuntainen	1.681952357	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0.018069339	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2.018081703	

Toisella tutkimuskysymyksellä pyrimme selvittämään, onko näytteiden säilytysajalla tilastollista merkitystä plasman ja seerumin ApoA1 ja ApoB pitoisuuteen. Aloitimme vertailemalla tuorenäytteenä otettua ApoA1 seerumia ja jääkaapissa säilytettyä ApoA1 seerumia. F-testin tuloksena saimme, että nollahypoteesi pätee ja varianssit voidaan olettaa tilastollisesti yhtä suuriksi. Myös t-testissä saamiemme tulosten kohdalla nollahypoteesi oli voimassa ja niiden perusteella voimme päätellä, että tuorenäytteenä analysoidun ja jääkaapissa säilytetyn ApoA1 seerumin pitoisuuksien välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. Teimme samat tutkimukset myös tuorenäyte ApoA1 plasman ja jääkaapissa säilytetyn ApoA1 plasman välillä. F-testin antamien tulosten perusteella nollahypoteesi on voimassa näidenkin analyttien kohdalla. T-testissä saadut tulokset tukevat myös nollahypoteesia, joten voidaan olettaa, että tuorenäyte ApoA1 plasman ja jääkaappisäilytetyn ApoA1 plasman pitoisuuksien välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. Teimme vertailut myös tuorenäyte ApoB seerumin ja jääkaappisäilytetyn ApoB seerumin sekä tuorenäyte ApoB plasman ja jääkaappisäilytetyn ApoB plasman välillä. Testien antamien tulosten perusteella päädyimme tulokseen, että tuorenäyte ApoB seerumin ja jääkaappi säilytetyn ApoB seerumin eikä tuorenäyte ApoB plasman ja jääkaappisäilytetyn ApoB plasman pitoisuuksien välillä ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta.

Seuraavaksi vertailimme kutakin tuorenäytteenä otettua analyyttiä vastaaviin pakasteissa säilytettyihin analyytteihin. Aloitimme jälleen vertailemalla ApoA1 seerumeita. F-testin tuloksesta (Taulukko 6) näemme, että $F = 2.439$ ja F-kriittinen yksisuuntainen = 2.168. Koska $F > F$ -kriittinen yksisuuntainen, nollahypoteesi kumotaan. Tämän perusteella voimme siis päätellä, että kahden joukon varianssit ovat tilastollisesti erisuuria.

Taulukko 6. F-testi tuorenäyte ApoA1 seerumin ja pakastimessa säilytetyn ApoA1 seerumin välillä.

	<i>ApoA1 seerumi pakastin (g/l)</i>	<i>ApoA1 seerumi tuore (g/l)</i>
Keskiarvo	1.777	1.643
Varianssi	0.032603684	0.013366842
Havainnot	20	20
va	19	19
F	2.439146356	
P($F \leq f$) yksisuuntainen	0.029519714	
F-kriittinen yksisuuntainen	2.168251601	

Suoritimme ApoA1 seerumien välillä kahden otoksen t-testin olettaen varianssit erisuuriksi (Taulukko 7). T-testin tuloksena saimme t Tunnusluvut = -2.795 ja t-kriittinen kaksisuuntainen 2.037. Koska t Tunnusluvut < -t-kriittinen kaksisuuntainen voimme kumota nollahypoteesin. Myös $p = 0.008$ tukee nollahypoteesiamme. Tämän perusteella voimme siis päätellä, että tuorenäyte ApoA1 seerumin ja pakastimessa säilytetyn ApoA1 seerumin välisillä pitoisuuksilla on tilastollisesti merkittävä eroavaisuus.

Taulukko 7. T-testi tuorenäyte ApoA1 seerumin ja pakastimessa säilytetyn ApoA1 seerumin välillä.

	<i>ApoA1 seerumi tuore (g/l)</i>	<i>ApoA1 seerumi pakastin (g/l)</i>
Keskiarvo	1.643	1.777
Varianssi	0.013366842	0.032603684
Havainnot	20	20
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	32	
t Tunnusluvut	-2.794988712	
P($T \leq t$) yksisuuntainen	0.004349887	
t-kriittinen yksisuuntainen	1.693888748	
P($T \leq t$) kaksisuuntainen	0.008699774	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2.036933343	

Teimme samat testit myös tuorenäyte ApoA1 plasman ja pakastimessa säilytetyn ApoA1 plasman välillä. F-testin antamien tulosten perusteella nollahypoteesi pysyi näiden analyyttien välillä voimassa, eli varianssit voitiin olettaa tilastollisesti yhtä suuriksi. Myös t-testin antaman tuloksen perusteella nollahypoteesi pysyi voimassa. Näiden tulosten avulla voimme siis päätellä, että tuorenäyte ApoA1 plasman ja pakastimessa säilytetyn ApoA1 plasman pitoisuuksien välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta.

Tuorenäyte ApoB seerumin ja pakastettuna säilytetyn ApoB seerumin välisissä testeissä pystyimme myös toteamaan varianssit tilastollisesti yhtä suuriksi. T-testin perustella pystyimme myös päättämään, että näiden analyyttien välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta.

Viimeisenä vertailimme tuorenäyte ApoB plasmaa ja pakastimessa säilytettyä ApoB plasmaa. F-testissä (Taulukko 8) saamiemme tulosten perusteella kumosimme nollahypoteesin, sillä $F > F$ -kriittinen yksisuuntainen. Tämän perusteella voimme siis päätellä, että varianssit eivät ole tilastollisesti yhtä suuria.

Taulukko 8. F-testi tuorenäyte ApoB plasman ja pakastimessa säilytetyn ApoB plasman välillä.

	<i>ApoB plasma tuore (g/l)</i>	<i>ApoB plasma pakastin (g/l)</i>
Keskiarvo	0.989	0.89475
Varianssi	0.083241053	0.033464408
Havainnot	20	20
va	19	19
F	2.487450335	
P(F<=f) yksisuuntainen	0.02692035	
F-kriittinen yksisuuntainen	2.168251601	

F-testissä saamiemme tulosten nojalla suoritimme kahden otoksen t-testin (Taulukko 9) olettaen varianssit erisuuriksi. Testin tulosten perusteella t Tunnusluvut $>$ -t-kriittinen kaksisuuntainen ja t Tunnusluvut $<$ t-kriittinen kaksisuuntainen. Voimme siis todeta, että nollahypoteesi pysyy voimassa ja vertailtavien arvojen välillä ei ole tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta.

Taulukko 9. T-testi tuorenäyte ApoB plasman ja pakastimessa säilytetyn ApoB plasman välillä.

	<i>ApoB plasma tuore (g/l)</i>	<i>ApoB plasma pakastin (g/l)</i>
Keskiarvo	0.989	0.89475
Varianssi	0.083241053	0.033464408
Havainnot	20	20
Arvioitu keskiarvojen ero	0	
va	32	
t Tunnusluvut	1.233817053	
P(T<=t) yksisuuntainen	0.113128302	
t-kriittinen yksisuuntainen	1.693888748	
P(T<=t) kaksisuuntainen	0.226256603	
t-kriittinen kaksisuuntainen	2.036933343	

8 Pohdinta

Opinnäytetyömme tarkoitus oli tutkia plasman ja seerumin ApoA1 ja ApoB pitoisuuksien eroavaisuutta. Tämän lisäksi tutkimme ApoA1 ja ApoB säilyvyyttä seerumissa ja plasmassa kolmena eri ajanjaksolla. Suoritimme tutkimukset 22:lle seerumi- ja 22:lle plasmanäytteelle.

8.1 Tulosten tarkastelu

Tuorenäytteiden sisällä tehdyissä plasman ja seerumin ApoA1 ja ApoB pitoisuusvertailuissa ei havaittu tulostemme mukaan tilastollisesti merkittäviä eroavaisuuksia. Seerumista mitatut pitoisuudet antoivat keskiarvallisesti hieman korkeampia tuloksia vertailtaessa plasmaan, mutta tilastollista merkittävyyttä ei voitu todeta. Jääkaapissa säilytettyjen näytteiden kohdalla ei ollut myöskään havaittavista tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta, kun tutkimiamme analyytteja vertailtiin seerumista ja plasmasta mitattuina. Jääkaapinäytteiden kohdalla oli myös havaittavissa, että seerumista mitatut ApoA1 ja ApoB pitoisuudet olivat hieman korkeampia. Pakastimessa säilytettyjen näytteiden kohdalla tilastollista eroavaisuutta puolestaan oli havaittavissa. Merkittävää eroavaisuutta oli havaittavissa, kun vertailtiin seerumin ApoB pitoisuutta plasman ApoB pitoisuuteen. Pakastetun seerumin ApoA1 ja plasman ApoA1 väliset pitoisuuserot olivat selkeästi kasvaneet säilytyksessä, mutta tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta niiden välillä ei voitu kuitenkaan todeta.

Vertailtaessa tuorenäytteistä mitattuja seerumin ja plasman ApoA1 pitoisuuksia jääkaapissa säilytettyihin vastaaviin näytteisiin, ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. Tulos oli sama, kun vastaava vertailu suoritettiin ApoB analyysille. Vähäistä keskiarvollaista muutosta oli havaittavissa sekä ApoA1:n että ApoB:n kohdalla. Vertailtaessa tuorenäytteiden seerumin ApoA1 pitoisuuksia pakastimessa säilytettyihin vastaavien ApoA1 seeruminäytteiden pitoisuuksiin oli havaittavissa merkittävää tilastollista eroavaisuutta. Pakastimessa säilytettyjen näytteiden seerumin ApoA1 pitoisuuksien keskiarvot olivat huomattavasti korkeammat kuin tuorenäytteistä mitatut. Pitoisuus oli n. 7,5 % pienempi tuorenäytteessä. Myös samankaltaista lähes kymmenen prosentin nousua seerumin ApoA1 pitoisuudessa havaittiin Riepposen, Mariniemen ja Rautaojan tutkimuksessa. Tutkimuksessa näytettä oli tosin säilytetty 4 viikkoa jääkaapissa. (Riepponen – Marniemi – Rautaoja 1987.) Tuorenäytteiden plasman ApoA1 pitoisuuksien ja pakastetun plasman ApoA1 pitoisuuksien välillä tilastollista merkittävyyttä ei ollut havaittavissa. Myöskään vastaavassa seerumin ja plasman ApoB pitoisuusvertailussa ei voitu todeta tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta.

8.2 Johtopäätökset

Puhtaasti tämän opinnäytetyön tuloksia tarkastellessa voimme todeta, että tuorenäytteestä tai kolme päivää jääkaapissa säilytetystä näytteestä voidaan tehdä ApoA1 tai ApoB määrittäminen riippumatta siitä, käytetäänkö näytemateriaalina seerumia tai plasmaa. Tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta ei ollut havaittavissa. Pitoisuuksien vaihtelu kasvoi huomattavasti, kun analysoitiin kolme kuukautta pakastimessa olleita näytteitä. Tulosten perusteella ei ole luotettavaa käyttää ainakaan näin pitkään säilöttyjä näytteitä, kun halutaan mitata seerumista tai plasmasta ApoA1 ja ApoB pitoisuuksia. Emme kuitenkaan voi olla varmoja siitä, soveltuuko juuri tässä opinnäytetyössä käyttämämme tilastollinen metodi parhaiten näiden analyyttien vertailuun. Tutkimus tulisi myös toistaa suuremmilla näytemäärillä, jotta tutkimustulokset olisivat vielä luotettavampia. Tulevissa tutkimuksissa olisi myös hyvä käyttää eri aikavälejä näytteiden analysointiin. Pakastenäytteet voisi esimerkiksi analysoida jo kahden kuukauden säilytyksen jälkeen, jotta saataisiin tarkempaa tietoa pitoisuuden muutosnopeudesta.

8.3 Tutkimuksen eettisyys

Kaikilta, jotka luovuttivat opinnäytetyötämme varten käytettävää näyttemateriaalia, pyydettiin allekirjoitus laatimaamme suostumussopimukseen. Kaikkia näytteitä käsiteltiin anonymisti merkitsemällä ne ainoastaan näytenumerolla. Näytteet heitettiin käytön jälkeen pois biologiseen jäteastiaan. Tutkimuksiin osallistuneille kerrottiin ennen tutkimukseen osallistumista selkeästi, mihin näytteitä käytetään ja missä niitä käytetään. Teimme myös selväksi sen, että opinnäytetyötutkimukseen osallistuminen on täysin vapaaehtoista ja tutkimukseen osallistumisesta oli mahdollisuus kieltäytyä. Annoimme myös osallistujille mahdollisuuden esittää täydentäviä kysymyksiä, mikäli jokin seikka jäi epäselväksi. Tutkimuksen tavoitteena ei ole tuottaa rahallista hyötyä millekään yritykselle tai kellekään yksityishenkilölle. Tutkimuksen tavoitteena on parantaa bioanalytiikan koulutusohjelman laatua tutkimuksessa saatujen tulosten kautta ja tällä tavoin taata tuleville opiskelijoille ammatillisesti pätevämpää koulutusta.

8.4 Lähteiden eettisyys ja lähdekritiikki

Opinnäytetyöhön tuotettu teksti on täysin meidän itsemme kirjoittamaa. Työtä ei ole kirjoitettu plagioimalla jonkun toisen kirjoittamaa tekstiä. Kaikki työssämme esitetyt väitteet perustuvat tutkittuun tietoon ja niiden yhteyteen merkityistä lähdeviitteistä käy ilmi, mistä lähteestä kyseinen väite on peräisin. Opinnäytetyössä käyttämistämme lähteistä on tarkistettu, kuka tiedon on tuottanut ja missä tieto on tuotettu. Pyrimme korostamaan lähteittemme luotettavuutta keskittymällä tiedonhaussa tieteellisiin artikkeleihin, jotka on julkaissut jokin luotettava taho. Myös lähdeviitteet käyttämiemme lähteiden sisällä on pyritty huomioimaan parhaamme mukaan. Tavoitteemme oli käyttää mahdollisimman tuoreita julkaisuja opinnäytetyössämme. Lähteistä löytyy yksi hieman vanhempi julkaisu, mutta se liitettiin mukaan samankaltaisen mittausprosessin vuoksi.

Esitämme tutkimuksissa saamamme tulokset rehellisesti emmekä ole muunnelleet saamiemme tuloksia, jollekin tietylle taholle edullisiksi. Mittauksissa tapahtuneet virheet on kirjattu mukaan työhön ja ne on otettu huomioon tulosten tarkastelussa. Työmme tarkoitus ei ole esittää harhaanjohtavaa tietoa, vaan edistää ammatin kehitystä ja tällä tavoin ihmisten terveyttä.

8.5 Luotettavuus

Tutkimustemme mittakaava ei ollut kovin suuri, resurssien ja ajan rajallisuuden luomien olosuhteiden vuoksi. Tutkimuksissa käytettyjen näytteiden lukumäärä oli yhteensä 44 kappaletta, joten tulokset eivät tästä syystä välttämättä anna täysin tilastollisesti täsmällistä kuvaa.

Tuorenäyttemittausten ja säilyvyysvertailujen kohdalla käytimme testeissämme vain kahtakymmentä seeruminäytettä ja kahtakymmentä plasmanäytettä. Tämä johtui tuorenäyttemittauksissa tapahtuneesta manuaalisesti virheestä, jossa osa rinnakkaismittauksista jäi suorittamatta. Päätimme jättää kyseiset näytteet pois, sillä halusimme kaikkien t-testissä käyttämämme arvojen muodostuvan vähintään kahden rinnakkaismittauksen keskiarvosta. Tällä tavoin pyrimme vähentämään analysaattorista syntyvän mittausvirheen vaikutusta tuloksiin. Näytteiden jäädessä pois, näytteiden lukumäärä kuitenkin väheni, joten sitä kautta vaikutusta tuloksiin syntyi. Vaikutus on oletettavasti kuitenkin niin vähäinen, että sillä ei olisi ollut vaikutusta tarkasteluvaiheessa käymiimme lopputuloksiin.

Kuvailimme tutkimuksemme toteutusvaiheen juuri sillä tavalla, kun se todellisuudessa suoritettiin. Kuvailu on suoritettu tarkasti ja yksityiskohtaisesti, jotta sen voisi toteuttaa jatkossa uudestaan. Mahdollisimman tarkan kuvailun tavoitteena on myös lisätä tutkimuksen luotettavuutta. Säilössä olleet näytteet sekoitettiin huolellisesti ennen näytteenottoa, jotta ne eivät antaisi kerrostumisen vuoksi epätarkkoja arvoja. Näytteiden säilytysolosuhteisiin emme pystyneet vaikuttamaan koko aikaa, mikäli esimerkiksi jääkaapissa tai pakastimessa on ilmennyt jokin vikatila, joka on vaikuttanut näytteiden säilyvyyteen. Emme kuitenkaan saaneet tietoomme, että mitään tämänkaltaista olisi tapahtunut, joten oletamme näytteiden säilyneen oikeissa lämpötilaolosuhteissa.

8.6 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyötä tehdessä koimme monipuolista ammatillista kasvua. Pääsimme suorittamaan kaikki näytteiden tutkimukseen liittyvät prosessit kokonaisuudessaan näytteenotosta tulosten analysoimiseen saakka täysin itsenäisesti. Tarkkuus, suunnitelmallisuus ja järjestelmällisyys olivat tärkeässä roolissa opinnäytetyömme onnistumisen kannalta. Koimme kehittyneemme näillä osa-alueilla suunnitellessamme ja toteuttaessamme

opinnäytetyötämme. Tilastollisten menetelmien siirtämisessä käytäntöön koimme oppineemme paljon uutta ja taulukkolaskentaohjelman käytössä oli havaittavissa huomattavaa kehitystä. Aikaisemmin osaaminen oli lähinnä lukuarvojen sijoittamista taulukkoon, ymmärtämättä tapahtumien kulkua sen tarkemmin. Aiheen opiskelun ja tekemisen kautta opimme lopulta ymmärtämään ainakin suurimmilta osin, mitä taulukko-ohjelma tekee syöttämillämme lukuarvoilla ja mitä saamamme arvot ylipäättänsä tarkoittavat. Opinnäytetyön tekeminen oli paikoitellen hyvinkin raskasta, mutta sen tekemisen kautta saavutimme lisää itsevarmuutta tiedostamalla pystyvämme tekemään luotettavia mittauksia täysin itsenäisesti.

Lähteet

Abbott Laboratories 2020. Clinical Chemistry Learning guide series. Verkkodokumentti. <https://www.corelaboratory.abbott/sal/learningGuide/ADD-00061345_ClinChem_Learning_Guide.pdf>. Luettu 27.9.2020

Boyanton, B. L. – Blick, K. E. 2002. Stability Studies of Twenty-Four Analytes in Human Plasma and Serum. Verkkodokumentti. <<http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/48/12/2242.full.pdf>>. Luettu 26.03.2021

Chistiakov, Dmitry A — Orekhov, Alexander N — Bobryshev, Yuri V. 2016. ApoA1 and ApoA1-specific sel-antibodies in cardiovascular disease. Luettavissa sähköisesti. <<https://www.nature.com/articles/labinvest201656>>. Luettu 27.9.2020

Duodecim Käypä hoito 2020. Dyslipidemiat. Luettavissa sähköisesti. <<https://www.kaypahoito.fi/hoi50025#readmore>>. Luettu 27.9.2020

Eskelinen, Seija 2016A. HDL-kolesteroli eli "hyvä kolesteroli" (fP-Kol-HDL). Luettavissa sähköisesti. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03083>. Luettu 27.9.2020

Eskelinen, Seija 2016B. LDL-kolesteroli eli "paha kolesteroli" (fP-Kol-LDL). Luettavissa sähköisesti. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03082&p_hakusana=ldl-kolesteroli>. Luettu 27.9.2020

HUSLAB 2020. Tutkimusohjekirja. FS-Lipoproteiinit, apo A1 ja apo B. Verkkodokumentti. <https://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=20705&terms=apo>. Luettu 24.03.2021

Kim, T. K. 2015. T test as a parametric statistic. Korean journal of anesthesiology, 68(6), 540. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4667138/>>. Luettu 19.4.2021.

Lane, David M 2003. Introduction to statistics. Luettavissa sähköisesti. <https://onlinesatbook.com/Online_Statistics_Education.pdf>. Luettu 19.4.2021.

Leino, Aila – Koivula, M-K 2008. Stability of chemical and immunochemical analytes in uncentrifuged plasma samples. Luettavissa sähköisesti. <https://www.researchgate.net/publication/23798268_Stability_of_chemical_and_immunochemical_analytes_in_uncentrifuged_plasma_samples>. Luettu 01.04.2021

Leiviskä, Jaana — Sundvall, Jouko — Jauhiainen, Matti — Laatikainen, Tiina 2014. Apolipoproteiinit A-I ja B. Verkkodokumentti. <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo11960.pdf>>. Luettu 01.4.2021

Mahley, Robert W. — Innerarity, Thomas L. — Rall, Stanley C. — Weisgraber, Karl H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research*, Volume 25. Verkkodokumentti. <<https://www.jlr.org/content/25/12/1277.full.pdf>>. Luettu 27.9.2020.

Marcovina, S. — Packard, C.J. 2006. Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. Luettavissa sähköisesti. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2796.2006.01648.x>>. Luettu 27.9.2020.

Marques, Leandro R. — Diniz, Tiego A. — Antunes, Barbara M. — Rossi, Fabricio E. — Caperuto, Erico C. — Lira, Fábio S. — Conclaves, Daniela C. 2018. Luettavissa sähköisesti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5962737/>>. Luettu 27.9.2020

Matikainen, Anna-Mari — Miettinen, Marja — Wasström, Kalle 2010. Näytteenottajan käsikirja. Helsinki: Edita.

Riepponen, Pekka — Marniemi, Jukka — Rautaoja, Tapio 1987. Immunoturbidimetric determination of apolipoproteins A-1 and B in serum. Verkkodokumentti. <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00365518709168939?needAccess=true>>. Luettu 07.04.2021

Riistama-Laari, S. — Kurki, K. — Määttä, U. — Tikanoja S. — Lampinen H. 2014. Apo A1 and apo B assays for thermo scientific indiko and indiko plus clinical chemistry analyzers. Verkkodokumentti. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CDD/posters/APOA1-APOB-Indiko-Plus-poster-EN.pdf>>. Luettu 27.9.2020

Syvänne, Mikko 2015. Lipoproteiinit ja niiden aineenvaihdunta. Luettavissa sähköisesti. <<https://sydan.fi/fakta/lipoproteiinit-ja-niiden-aineenvaihdunta>>. Luettu 27.9.2020

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos THL. 2011. Uutta sydän- ja verisuonitautien riskin arvioinnissa – kolesterolista apolipoproteiineihin. Verkkodokumentti. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveysportti/uutissorvi_uusi.uutissivu?p_uutis_id=14695&p_palsta_id=23>. Luettu 27.9.2020

Thermo Scientific 2018. Indiko and Indiko Plus clinical and specialty chemistry analyzers. Käyttöohje. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CDD/brochures/Indiko%20and%20Indiko%20Plus%20Brochure.pdf>>. Luettu 25.03.2021

Tapola, Hilikka 2004. Näytteiden käsittely ja lähettäminen sekä kuljetus. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.). Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Tuokko, Seija – Rautajoki, Anja – Lehto, Liisa 2008. Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoa varten. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi

SUOSTUMUSASIAKIRJA NÄYTEMATERIAALIN LUOVUTUKSEEN

07.12.2020

Minua on pyydetty luovuttamaan näytemateriaalia opinnäytetyöhön, jonka tarkoituksena on kehittää Metropolia Ammattikorkeakoulun biokemian opetusta. Olen saanut mahdollisuuden esittää tarkentavia kysymyksiä ja keskustella niistä. Tunnen saaneeni riittävästi tietoa oikeuksistani, tutkimuksen tarkoituksesta ja siihen osallistumisesta.

Tiedän, että tutkimukseen osallistuminen on vapaaehtoista ja että minulla on oikeus kieltäytyä tutkimukseen osallistumisesta. Tiedän, että minusta kerättyjä tietoja käsitellään luottamuksellisesti eikä niitä luovuteta ja ne hävitetään tutkimuksen valmistuttua tai arkistoidaan suostumukseni mukaan Metropolian arkistoihin.

Suostun luovuttamaan näytemateriaalia: Kyllä ___ Ei ___

Paikka: **Metropolia Ammattikorkeakoulu, Myllypuron kampus**

Aika: **07.12.2020**

Osallistujan nimi: _____

Osallistujan allekirjoitus: _____

Opinnäytetyön tekijän nimi: _____

Opinnäytetyön tekijän allekirjoitus: _____

Opinnäytetyön vastaavana henkilönä toimii: _____

	Tuorenäyte huoneenlämpöisenä			
	APO A1 seerumi (g/l)	APO A1 plasma (g/l)	APO B seerumi (g/l)	APO B plasma (g/l)
Näyte 1 mittaus 1	1.92	1.92	0.85	0.74
Näyte 1 mittaus 2	1.91	1.9	0.83	0.74
Näyte 2 mittaus 1	1.9	1.91	0.82	0.76
Näyte 2 mittaus 2	1.94	1.9	0.83	0.75
Näyte 3 mittaus 1	1.59	1.6	0.72	0.68
Näyte 3 mittaus 2	1.57	1.6	0.72	0.68
Näyte 4 mittaus 1	1.65	1.61	0.73	0.69
Näyte 4 mittaus 2	1.62	1.64	0.73	0.68
Näyte 5 mittaus 1	1.73	1.73	0.85	0.79
Näyte 5 mittaus 2	1.74	1.72	0.84	0.81
Näyte 6 mittaus 1	1.74	1.73	0.84	0.79
Näyte 6 mittaus 2	1.74	1.7	0.84	0.79
Näyte 7 mittaus 1	1.75	1.72	0.85	0.82
Näyte 7 mittaus 2	1.75	1.73	0.84	0.91
Näyte 8 mittaus 1	1.57	1.58	1.11	1.05
Näyte 8 mittaus 2	1.58	1.56	1.13	1.16
Näyte 9 mittaus 1	1.62	1.59	1.14	1.05
Näyte 9 mittaus 2	1.61	1.6	1.13	1.1
Näyte 10 mittaus 1	1.61	1.6	1.13	1.08
Näyte 10 mittaus 2	1.6	1.61	1.15	1.05
Näyte 11 mittaus 1	1.67	1.7	1.27	1.15
Näyte 11 mittaus 2	-	-	-	-
Näyte 12 mittaus 1	1.7	1.67	1.3	1.15
Näyte 12 mittaus 2	-	-	-	-
Näyte 13 mittaus 1	1.55	1.5	1.7	1.41
Näyte 13 mittaus 2	1.54	1.49	1.71	1.42
Näyte 14 mittaus 1	1.56	1.5	1.71	1.4
Näyte 14 mittaus 2	1.55	1.48	1.75	1.41
Näyte 15 mittaus 1	1.56	1.48	1.72	1.48
Näyte 15 mittaus 2	1.57	1.5	1.71	1.43
Näyte 16 mittaus 1	1.57	1.48	1.7	1.44
Näyte 16 mittaus 2	1.54	1.51	1.7	1.41
Näyte 17 mittaus 1	1.54	1.46	1.33	1.08
Näyte 17 mittaus 2	1.53	1.47	1.3	1.09
Näyte 18 mittaus 1	1.58	1.46	1.35	1.08
Näyte 18 mittaus 2	1.59	1.45	1.34	1.1
Näyte 19 mittaus 1	1.55	1.47	1.3	1.08
Näyte 19 mittaus 2	1.56	1.44	1.3	1.07
Näyte 20 mittaus 1	1.56	1.45	1.32	1.15
Näyte 20 mittaus 2	1.56	1.46	1.3	1.11
Näyte 21 mittaus 1	1.65	1.66	0.63	0.57
Näyte 21 mittaus 2	1.64	1.63	0.64	0.57
Näyte 22 mittaus 1	1.7	1.65	0.64	0.57
Näyte 22 mittaus 2	1.68	1.68	0.63	0.57

	Kolmen päivän säilytys jääkaapissa			
	APO A1 seerumi (g/l)	APO A1 plasma (g/l)	APO B seerumi (g/l)	APO B plasma (g/l)
Näyte 1 mittaus 1	1.93	1.87	0.81	0.73
Näyte 1 mittaus 2	1.9	1.89	0.81	0.73
Näyte 2 mittaus 1	1.88	1.88	0.83	0.76
Näyte 2 mittaus 2	1.9	1.89	0.81	0.77
Näyte 3 mittaus 1	1.56	1.63	0.72	0.69
Näyte 3 mittaus 2	1.57	1.59	0.72	0.75
Näyte 4 mittaus 1	1.6	1.57	0.73	0.7
Näyte 4 mittaus 2	1.64	1.58	0.73	0.69
Näyte 5 mittaus 1	1.73	1.72	0.85	0.8
Näyte 5 mittaus 2	1.73	1.72	0.86	0.8
Näyte 6 mittaus 1	1.75	1.71	0.84	0.8
Näyte 6 mittaus 2	1.73	1.74	0.84	0.8
Näyte 7 mittaus 1	1.74	1.73	0.86	0.81
Näyte 7 mittaus 2	1.74	1.73	0.86	0.81
Näyte 8 mittaus 1	1.58	1.61	1.09	1.06
Näyte 8 mittaus 2	1.58	1.58	1.13	1.05
Näyte 9 mittaus 1	1.62	1.59	1.14	1.08
Näyte 9 mittaus 2	1.64	1.59	1.13	1.07
Näyte 10 mittaus 1	1.59	1.61	1.14	1.07
Näyte 10 mittaus 2	1.61	1.58	1.15	1.07
Näyte 11 mittaus 1	1.71	1.66	1.28	1.16
Näyte 11 mittaus 2	1.68	1.69	1.28	1.15
Näyte 12 mittaus 1	1.69	1.65	1.3	1.16
Näyte 12 mittaus 2	1.68	1.64	1.28	1.17
Näyte 13 mittaus 1	1.54	1.55	1.64	1.55
Näyte 13 mittaus 2	1.53	1.5	1.64	1.54
Näyte 14 mittaus 1	1.55	1.5	1.71	1.58
Näyte 14 mittaus 2	1.56	1.51	1.69	1.58
Näyte 15 mittaus 1	1.53	1.49	1.69	1.51
Näyte 15 mittaus 2	1.53	1.41	1.73	1.52
Näyte 16 mittaus 1	1.58	1.49	1.7	1.53
Näyte 16 mittaus 2	1.54	1.55	1.7	1.5
Näyte 17 mittaus 1	1.53	1.47	1.32	1.11
Näyte 17 mittaus 2	1.52	1.48	1.28	1.13
Näyte 18 mittaus 1	1.52	1.47	1.28	1.12
Näyte 18 mittaus 2	1.54	1.5	1.29	1.1
Näyte 19 mittaus 1	1.55	1.47	1.32	1.1
Näyte 19 mittaus 2	1.54	1.46	1.29	1.12
Näyte 20 mittaus 1	1.55	1.46	1.29	1.11
Näyte 20 mittaus 2	1.55	1.48	1.29	1.12
Näyte 21 mittaus 1	1.66	1.66	0.59	0.53
Näyte 21 mittaus 2	1.69	1.66	0.59	0.56
Näyte 22 mittaus 1	1.68	1.63	0.61	0.57
Näyte 22 mittaus 2	1.71	1.64	0.61	0.56

	Kolmen kuukauden säilytys pakastimessa			
	APO A1 seerumi (g/l)	APO A1 plasma (g/l)	APO B seerumi (g/l)	APO B plasma (g/l)
Näyte 1 mittaus 1	2.09	2.05	0.87	0.77
Näyte 1 mittaus 2	2.09	2.04	0.85	0.78
Näyte 2 mittaus 1	2.02	2.1	0.82	0.79
Näyte 2 mittaus 2	2.04	2.08	0.82	0.78
Näyte 3 mittaus 1	1.74	1.71	0.76	0.72
Näyte 3 mittaus 2	1.74	1.68	0.75	0.71
Näyte 4 mittaus 1	1.73	1.75	0.77	0.74
Näyte 4 mittaus 2	1.72	1.74	0.78	0.73
Näyte 5 mittaus 1	1.9	1.84	0.87	0.81
Näyte 5 mittaus 2	1.87	1.87	0.88	0.8
Näyte 6 mittaus 1	1.9	1.89	0.91	0.84
Näyte 6 mittaus 2	1.89	1.88	0.9	0.85
Näyte 7 mittaus 1	1.87	1.85	0.89	0.81
Näyte 7 mittaus 2	1.87	1.87	0.89	0.82
Näyte 8 mittaus 1	1.75	1.7	1.15	1
Näyte 8 mittaus 2	1.69	1.71	1.13	0.95
Näyte 9 mittaus 1	1.69	1.65	1.16	0.99
Näyte 9 mittaus 2	1.71	1.68	1.15	1
Näyte 10 mittaus 1	1.68	1.55	1.11	0.95
Näyte 10 mittaus 2	1.69	1.54	1.13	0.88
Näyte 11 mittaus 1	1.77	1.7	1.25	1.1
Näyte 11 mittaus 2	1.74	1.72	1.26	1.1
Näyte 12 mittaus 1	1.76	0.92	1.29	1.04
Näyte 12 mittaus 2	1.75	1.8	1.26	1.14
Näyte 13 mittaus 1	1.93	1.52	1.67	1.06
Näyte 13 mittaus 2	1.92	1.47	1.69	1.07
Näyte 14 mittaus 1	1.81	1.51	1.58	1.14
Näyte 14 mittaus 2	1.83	1.52	1.57	1.13
Näyte 15 mittaus 1	1.3	1.54	1.06	1.11
Näyte 15 mittaus 2	1.29	1.58	1.05	1.12
Näyte 16 mittaus 1	1.85	1.51	1.62	1.11
Näyte 16 mittaus 2	1.85	1.49	1.61	1.13
Näyte 17 mittaus 1	2.01	1.64	1.64	1.01
Näyte 17 mittaus 2	2.02	1.6	1.63	1.05
Näyte 18 mittaus 1	1.62	1.65	1.27	1.1
Näyte 18 mittaus 2	1.63	1.65	1.28	1.02
Näyte 19 mittaus 1	1.67	1.45	1.3	0.94
Näyte 19 mittaus 2	1.65	1.47	1.3	0.94
Näyte 20 mittaus 1	1.58	1.53	1.25	1.01
Näyte 20 mittaus 2	1.58	1.54	1.22	1.02
Näyte 21 mittaus 1	1.71	1.7	0.61	0.53
Näyte 21 mittaus 2	1.7	1.69	0.6	0.53
Näyte 22 mittaus 1	1.72	1.63	0.61	0.53
Näyte 22 mittaus 2	1.73	1.67	0.61	0.52