

Ira Kangas

# Komplementin klassisen tien, lektiinitien ja oikotien aktiivisuuden säilyvyys seerumissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

10.12.2012

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Ira Kangas Komplementin klassisen tien, lektiinitien ja oikotien aktiivisuuden säilyvyys seerumissa  24 sivua + 2 liitettä 10.12.2012
Tutkinto	Bioanalyttikko AMK
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Lehtori Terttu-Liisa Lindell Laboratoriohoitaja Riitta Väisänen Erikoislääkäri Hanna Jarva
<p>Olen tehnyt opinnäytetyöni HUSLABiin kuuluvan immunologian yksikön toimenannosta. Työni tarkoitus oli tutkia, kuinka komplementtipuutosnäytteeseen (S-C-DEF) kuuluvien klassisen tien, lektiinitien ja oikotien aktiivisuudet seerumissa muuttuvat erilaisissa lämpötilaolosuhteissa säilytettyinä. Tutkin myös seerumigeeliputken soveltuvuutta komplementtinäytteen säilytykseen. Aikaisempaa tutkimustietoa aiheestani ei ole, jonka takia työni HUSLABissa koettiin tarpeelliseksi.</p> <p>Otin verinäytteet kymmeneltä (n=10) terveeltä koehenkilöltä. Poikkeuksena oli, että yhdellä koehenkilöllä oli synnynnäinen lektiinitiepuutos. Kunkin koehenkilön verinäytteistä jaettiin yhdeksän seeruminäytettä, joita säilytin kohtien <b>A, B, C, D, E, F, G, H</b> ja <b>I</b> mukaisesti. Selvitin, kuinka komplementtiaktiivisuus säilyy eri tapauksissa. Verinäytteiden <b>A, B, C, D</b> annettiin seistä tunti ennen sentrifugointia, jonka jälkeen seerumit jaettiin ja <b>A</b> pakastettiin suoraan -20 °C, <b>B</b> säilytettiin +4 °C vuorokausi, <b>C</b> säilytettiin huoneenlämmössä vuorokausi ja <b>D</b> säilytettiin kolme vuorokautta +4 °C. Näytteet <b>E, F</b> seisoivat kaksi tuntia ennen sentrifugointia, jonka jälkeen seerumit jaettiin ja <b>E</b> pakastettiin -20 °C ja <b>F</b> säilytettiin kolme vuorokautta +4 °C. Tutkin myös, kuinka komplementtiaktiivisuus säilyy +37 °C olosuhteissa, kun seerumi seisoivat tunnin ennen sentrifugointia ja heti sentrifugoinnin jälkeen jaettiin ja <b>G</b> pakastettiin -20 °C ja <b>H</b> pakastettiin -20 °C, annettiin sulaa tunti huoneenlämmössä ja pakastettiin uudelleen. Kohdassa <b>I</b> selvitin komplementtiaktiivisuuden säilyvyyttä seerumigeeliputkessa HUSLABin normaalin käytännön mukaisesti (kohta <b>A</b>). Lopuksi pakastin kaikki näytesarjat -20 °C. Suoritin näytteiden analyysin Wieslab®-entsyymi-immunologisella menetelmällä käyttäen Labsystems iEMS Reader MF-fotometriä.</p> <p>Tulosteni mukaan klassisen tien, lektiinitien ja oikotien komplementtiaktiivisuus säilyy seerumissa hyvin kaikissa tutkimissani olosuhteissa. Näytesarja <b>A</b> on HUSLAB:n ohjeen mukaisesti käsitelty, jonka tuloksiin vertasin muita näytesarjoja. Ainoastaan klassisessa tiessä näytesarja <b>C</b> säilyy huonosti verrattuna normaaliin käytäntöön. Yksittäisiä epäonnistuneita tuloksia esiintyy lähes jokaisessa näytesarjassa. Mikäli HUSLAB aikoo lisätä komplementtitutkimuksen (S-C-DEF) preanalyttisiin ohjeisiin jonkin tutkimani säilytysmenetelmän, kannattaa siitä tämän vuoksi tehdä uusi koesarja rinnakkaisnäytteitä käyttäen.</p>	
Avainsanat	komplementtipuutosnäyte, seerumi, säilyvyys

Author Title	Ira Kangas The Preservation of Classical, MBL and Alternative Pathways of Complement in Sera
Number of Pages Date	24 pages + 2 appendices 10 December 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Program	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Terttu-Liisa Lindell, Senior Lecturer Riitta Väisänen, Biomedical Laboratory Scientist Hanna Jarva, Specialist
<p>The purpose of this study was to find out how the classical, MBL and alternative pathways of complement in sera were activated in complement deficiency sample (S-C-DEF) when stored at different temperatures. I also studied if the gel tube was suitable for complement samples. There was no previous research into this subject, and therefore, HUSLAB, Helsinki, Finland, wanted me to perform this study.</p> <p>As for methods, I took blood samples on ten (n=10) healthy subjects with the exception that one subject had MBL deficiency. The blood samples were divided into nine sera samples that were stored according to cases <b>A, B, C, D, E, F, G, H</b> and <b>I</b>. I studied how complement activity was preserved in each case. Blood samples <b>A, B, C, D</b> allowed to rest for one hour before centrifugation, after which they were divided into sera samples. <b>A</b> samples were directly frozen at -20°C. <b>B</b> samples were stored at +4°C for one night. <b>C</b> samples were stored at room temperature for one night. <b>D</b> samples were stored for three nights at +4°C. Samples <b>E</b> and <b>F</b> were allowed to rest for two hours before centrifugation, after which they were divided into sera samples. <b>E</b> samples were directly frozen at -20°C. <b>F</b> samples were stored for three nights at +4°C. Samples <b>G</b> and <b>H</b> were stored at +37°C for one hour, then centrifuged at +37°C and divided into sera samples. <b>G</b> samples were directly frozen at -20°C. <b>H</b> samples were frozen at -20°C, allowed to melt at room temperature for one hour and then re-frozen. <b>I</b> samples were taken into gel tubes, allowed to rest for one hour before centrifugation, when frozen at -20°C. In the end, all samples were frozen at -20°C. The samples were analysed with the Wieslab® enzyme immunoassay technique using the Labsystems iEMS Reader MF photometry.</p> <p>According to my results, complement activity was preserved well in almost all of the studied conditions. The <b>A</b> samples were stored according to the HUSLAB's instructions. The results of other samples were compared to the <b>A</b> sample results. Only the <b>C</b> samples in classical pathway were preserved poorly compared to <b>A</b> sample. There were singular poorly preserved samples in almost every sample series. If HUSLAB wants to use one of these storing methods into their S-C-DEF pre-analytical instructions, another test series should be performed using parallel samples.</p>	
Keywords	complement deficiency sample, sera, preservation

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Komplementtijärjestelmä	2
2.1	Aktivaatitiet	2
2.1.1	Klassinen tie	2
2.1.2	Lektiinitie	3
2.1.3	Oikotie	3
2.2	Komplementtipuutokset	4
2.2.1	Perinnöllinen angioödeema	5
2.2.2	Lupus erythematosus disseminatus	5
2.2.3	Lisääntynyt infektioherkkyys	5
2.2.4	Munuaissairaudet	5
2.2.5	Kohtauksittainen yöllinen hemoglobiuria	6
2.3	Komplementin määrittäminen seerumista	6
3	Aikaisemmat tutkimukset	8
4	Työn tarkoitus ja työtä ohjaavat kysymykset	9
4.1	Komplementtiaktiivisuuden säilyvyys jääkaapissa ja huoneenlämmössä	9
4.2	Seisotusajan vaikutus ennen sentrifugointia komplementtiaktiivisuuteen	10
4.3	Komplementtiaktiivisuuden säilyminen +37 °C:een lämpötilaolosuhteissa	10
4.4	Seerumigeeliputken soveltuvuus komplementtitutkimukseen	11
5	Opinnäytetyön toteutus	12
6	Tulokset	13
6.1	Klassisen tien säilyvyyden tulokset	15
6.2	Lektiinitien säilyvyyden tulokset	16
6.3	Oikotien säilyvyyden tulokset	18
6.4	Yhteenveto tuloksista	19
7	Pohdinta tulosten luotettavuudesta	20

7.1	Satunnaisesti epäonnistuneet tulokset	20
7.2	Seerumin sulatus	21
7.3	Seerumin pipetointi	21
7.4	Muut virhelähteet	21
7.5	Tulosten käyttökelpoisuus	22
	Lähteet	23
	Liitteet	
	Liite 1. Koehenkilöltä otettujen seeruminäytteiden säilytykset	
	Liite 2. Tulokset	

## 1 Johdanto

Suoritan opinnäytetyöni HUSLABiin kuuluvan immunologian yksikön toimenannosta. Työni tarkoituksena on tutkia, kuinka komplementtipuutosnäytteeseen (S-C-DEF) kuuluvat klassisen tien, lektiinitien ja oikotien aktiivisuudet muuttuvat seerumissa erilaisissa lämpötilaolosuhteissa säilytettyinä. Tutkimukseni on tarpeellinen, koska HUSLAB tarvitsee tietoa komplementtinäytteen säilyvyydestä, eikä aikaisempia tutkimuksia tästä aiheesta ole saatavilla.

Komplementilla tarkoitetaan suurimmaksi osaksi luontaiseen immuunijärjestelmään kuuluvia proteiineja, joiden päätehtävänä on tuhota ja poistaa kehoon joutuneita mikro-  
beja ja vieraita rakenteita sekä välittää tulehdusreaktioita (Meri 2011: 53). Komplementtipuutokset aiheuttavat monia erityyppisiä sairauksia, kuten lisääntynyttä infektioherkyyttä, immuunikompleksitauteja tai syndroomia, joissa komplementti häiriintyy tuhoamaan omia kudoksia. Komplementtipuutosten seulonta kuuluu immuunipuutosten, autoimmuunitautien ja monien munuaistautien diagnostiikkaan. (Jarva ja Meri 2011: 276.)

Tutkimuksessani on mukana yhdeksän erilaista säilytysolosuhdetta (liite 1). Säilytysolosuhteet eroavat lämpötilan ja säilytysajan osalta. Näistä säilyvyysolosuhteista halutaan saada tietoa, sillä näytteenottolaboratoriossa komplementtinäytteen oikeaoppinen käsittely ei aina onnistu käytännön syistä. Näytteen säilyvyyttä +37 °C:een lämpötilaolosuhteessa tutkitaan, jotta saadaan selville, onko komplementti- ja kryoglobuliininäytettä mahdollista määrittää samasta näyteputkesta. Tutkimukseeni kuuluu myös selvittää seerumigeeliputken soveltuvuus komplementtipuutosnäytteen säilytykseen. Seerumia on mahdollista pipetoida geeliputkesta suoraan analyysiä varten. Tällöin seerumia ei tarvitsisi erotella erilliseen näyteputkeen. Tämä vähentäisi näytteiden kontaminaation riskiä ja henkilökunnan työvaiheita.

Mukana on HUSLABin preanalyttisen ohjeen (HUSLAB 2011) mukaisesti käsitelty näytesarja, johon vertaan muita, toisella tavalla käsiteltyjä näytesarjoja. Mikäli tuloksissa ilmenee, että seerumit säilyvät tutkimissani (liite 1) olosuhteissa, on HUSLABilla mahdollisuus muokata komplementtipuutosnäytteen preanalyttistä ohjetta näytteiden säilyvyyden osalta sekä siirtyä seerumigeeliputken käyttöön.

## 2 Komplementtijärjestelmä

Komplementti on ryhmä veren proteiineja, joiden päätehtävänä on tuhota ja poistaa kehoon joutuneita mikrobeja ja vieraita rakenteita sekä välittää tulehdusreaktioita. Se kuuluu pääosin luontaiseen immuunijärjestelmään, mutta auttaa myös merkittävästi opittua immunitteettia sen käynnistymisvaiheessa ja toimiessaan edesauttajana mm. vasta-aineiden vaikutuksille. Komplementti suorittaa tehtäviään plasmassa, jossa se toimii vaiheittain etenevänä ketjureaktiona klassisen tien, lektiinitien tai oikotien kautta. Komplementtiaktivaatiota säädellään tarkasti erilaisin säätelytekijöin, sillä liiallinen komplementtiaktivaatio voi aiheuttaa kudოსvauriota. (Meri 2011: 53-55.) Komplementtipuutokset aiheuttavat erilaisia sairauksia riippuen mikä osa komplementin toiminnasta on puutteellinen. Komplementtipuutosta epäiltäessä perustutkimuksiin kuuluu komplementtitoiminnan määrittäminen seerumista (S-C-DEF). (Jarva ja Meri 2000.)

### 2.1 Aktivaatiotiet

Komplementti voi aktivoitua kolmea erilaista tietä: klassista tietä, lektiinitietä tai oikotietä. Kaikille aktivaatioteille on tyypillistä C3-konvertaasin muodostus, joka pilkkoo komplementin pääproteiinia C3. Lopuksi muodostuu membraaneja tuhoava kompleksi (MAC). (Meri 2011: 53-55.) Seuraavissa luvuissa kuvaan pääpiirteittäin komplementin aktivaatioteiden vaiheet. Kuvio 1 havainnollistaa aktivaatioteiden päätapahtumat yksinkertaistettuina.

#### 2.1.1 Klassinen tie

Klassinen aktivoitumistie käynnistyy vasta-aineiden tartuttua kohderakenteisiinsa. Klassinen tie voi aktivoitua myös DNA-histonikompleksien tai C-reaktiivisen proteiinin vaikutuksesta. Aktivaatio alkaa, kun komponentti C1q tarttuu vasta-ainemolekyyliin. Aktivaatio etenee C4bC2a-konvertaasin muodostumiseen, joka sitoutuu kohderakenteen pinnalle. Tämä on klassisen tien pääentsyymi, joka pystyy aktivoimaan lukuisia C3- ja C5-molekyyliä. C3- ja C5-proteiineista poistuvat C3a- ja C5a-osat ovat tulehdusreaktioita aiheuttavia anafylatoksiineja. Muodostuvat C3b-molekyylit päällystävät kohderakenteen pinnan, jotta siinä olevat mikrobit on helpompi fagosytoida. C5b-9 molekyyleistä muodostuu membraaneja tuhoava kompleksi (MAC), joka muodostaa solu-

kalvoon ioneja läpäisevän reiän ja tämä johtaa solun kuolemaan. (Jarva ja Meri 2000; Meri 2011: 55-56.)

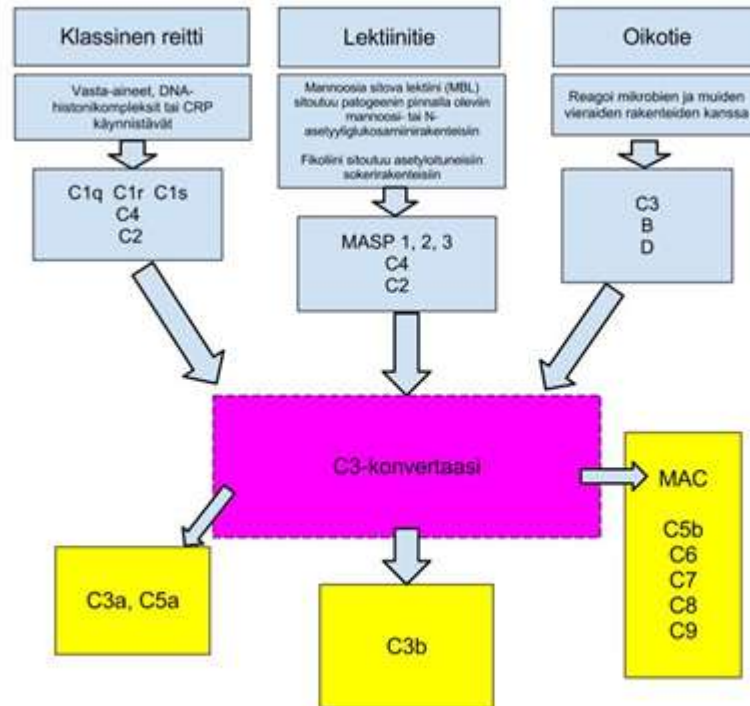
### 2.1.2 Lektiinitie

Lektiinitie käynnistyy, kun mannoosia sitova lektiini (MBL) sitoutuu mannoosia tai N-asetyyli-glukosamiinisokereita sisältäviin rakenteisiin, joita esiintyy eräiden mikrobien, kuten hiivojen, pinoilla. Myös fikoliinit voivat aktivoida lektiinitietä. Ne sitoutuvat asetyloituneisiin sokerirakenteisiin. Fikoliinit ja MBL ovat rakenteeltaan C1q-molekyylin kaltaisia. Fikoliineihin ja MBL:iin sitoutuu C1r:n ja C1s:n asemasta MASP1, -2 ja 3:ksi nimettyjä proteiineja. MASP2 on näistä tärkein, sillä se pilkkoo C4- ja C2-proteiineja aktiiviseksi C4b2a-konvertaasientsyymiksi. Lektiinitie etenee tästä eteenpäin klassisen tien kaltaisesti. MBL:n merkitystä immuunipuolustukselle ei vielä tarkoin tiedetä. (Meri 2011: 57.)

### 2.1.3 Oikotie

Oikotie voi aktivoitua vasta-aineista riippumatta. Oikotielle on ominaista jatkuvasti viritäytyneenä oleminen ja nopea reagointi mikrobien ja muiden vieraiden rakenteiden kanssa. Tämä perustuu C3:n jatkuvaan hydrolysoitumiseen, jolloin se muuttuu muotoon C3H2O. C3H2O sitoo tekijää B, joka puolestaan pilkkoutuu tekijä D:n avulla Bb:ksi. Muodostunut C3(H2O)Bb on aktiivinen konvertaasientsyymi, joka pilkkoo C3-molekyyliä C3a:ksi ja C3b:ksi. Mikäli aktivaattorin pinta on suotuisa C3b:lle, muuntuu tämä molekyyli oikotien C3 ja C5 konvertaasientsyymiksi C3bBb. Muodostunut konvertaasientsyymi sitoutuu kohteen pinnalle ja pilkkoo lukuisia uusia C3-molekyyliä C3b:ksi, jotka muodostavat uusia C3-konvertaasientsyymejä. Tähän toimintaan perustuu complementin oikotien tärkein ominaisuus, eli tehokas kyky voimistaa omaa aktivaatiotaan, jolloin complementtiaktivaatio voi jatkua. (Jarva ja Meri 2000 ; Meri 2011: 57-59.) C3 on tärkeä tekijä kaikissa complementin aktivaatioreiteissä. C3:n puutos sekä sen säätelijöihin liittyvät puutokset ovat harvinaisia. Nämä puutokset altistavat bakteeri-infektioille. Complementtireittien lopputeiden puutokset altistavat toistuvilla neisseria-infektioille, sillä membraanituhokompleksilla (MAC) on tärkeä merkitys gramnegatiivisten bakteerien torjunnassa. (Jarva ja Meri 2011: 277-279.)





Kuvio 1. Komplementin aktivaatioreitit (Overview of complement system 2006).

## 2.2 Komplementtipuutokset

Komplementtipuutoksia aiheuttavat komplementtijärjestelmässä yksittäisten tekijöiden tai niiden toiminnan puutokset. Komplementtipuutoksiin liittyy lisääntynyttä infektioherkkyttä, immunokompleksien aiheuttamia oireita, tietyntyyppisiä glomerulonefriittejä, turvotuskohtauksia tai suonensisäistä hemolyysiä riippuen komplementtipuutoksesta tai sen toimimattomuudesta. Tällöin tehdään komplementin toiminnan perustutkimus (S–C–DEF), johon kuuluu klassisen tien lektiinitien ja oikotien aktiivisuuksien, sekä C3- ja C4-pitoisuuksien määrytykset. Viitearvojen (luvussa 2.3) mukaan tutkitaan tarvittaessa tarkemmin komplementin osatekijöitä. Merkittävät komplementtipuutokset ovat harvinaisia, kun taas osittaiset komplementtipuutokset ovat melko yleisiä sattumalöydöksiä. Suomessa kliinisesti tärkeimmät komplementtipuutokset ovat C1-estäjän perinnöllinen puutos (perinnöllinen angioödeema), osittaiset C4-alleelien (C4A- tai C4B) puutokset ja kohtausittainen yöllinen hemoglobiuria. (Jarva ja Meri 2000.)

### 2.2.1 Perinnöllinen angioödeema

Perinnöllinen angioödeema (HAE) johtuu C1-komponentin toimintaa estävän molekyylin puuttumisesta, jolloin klassisen tien alkupää aktivoituu ajoittain hallitsemattomasti. HAE:n oireita ovat ajoittaiset, usein itsestään ohimenevät turvotuskohdat eri puolella kehoa. Usein laukaisevaa tekijää kohtaukselle ei löydy. Oireet alkavat yleensä nuoruusiässä ja lievenevät ikääntymisen myötä. (Jarva ja Meri 2000.)

### 2.2.2 Lupus erythematosus disseminatus

Lupus erythematosus disseminatus (SLE) on tauti, jossa komplementin kyky käsitellä immunokomplekseja on häiriintynyt. Tämä aiheuttaa immunokompleksien kertymistä kudoksiin, joka voi johtaa komplementin aktivaatioon ja tulehdusreaktioon. SLE-oireet liittyvät klassisen tien alkupään komponenttien (C1q, C1r, C1s) sekä C2- ja C4-puutoksiin. (Jarva ja Meri 2000.)

### 2.2.3 Lisääntynyt infektioherkkyys

Lisääntynyt, bakteerien aiheuttama infektioherkkyys liittyy moniin, kuten komponenttien C2, C3, C4 ja niiden säätelijätekijöiden H ja I puutoksiin. Komplementin loppupään tekijöiden C5-C9 ja oikotien properdiini-säätelijämolekyylin puutokset altistavat toistuville neisseria-infektioille, sillä tätä bakteeria tuhoaa komplementin aktivaatiossa lopussa muodostuva membraaneja tuhoava kompleksi. (Jarva ja Meri 2000.) Myös mannoosia sitovan lektiinin (MBL) puutos liittyy mahdollisesti lisääntyneeseen infektioherkkyteen. Tutkimustulokset tästä ovat ristiriitaisia. Noin 30 %:lta väestöstä puuttuu MBL, eikä puutos aiheuta suurimmalle osalle terveysongelmia. MBL saattaa olla tärkeä ensimmäisten elinvuosien aikana osana synnynnäistä immuniteettia, muttei enää myöhemmin. (Heitzeneder - Seidel - Förster-Waldl - Heitger 2012; Jarva ja Meri 2000.)

### 2.2.4 Munuaissairaudet

Komplementin häiriintynyt toiminta liittyy moniin munuaissairauksiin. Membranoproliferatiivisessa glomerulonefriitissä C3-nefriittitekijä (C3Nef) on auto-vasta-aine, joka kiinnittyy oikotien C3bBb-konvertaasientsyymiin ja tehostaa sen toimintaa. Voimakkaan aktivaation vuoksi kehittyi munuaisvaurio ja C3-puutos. Hemolyttis-ureeminen syn-

drooma (HUS) on oireyhtymä, johon liittyy endoteelivaurio, trombosytopenia ja munuaisten toiminnan häiriöt. Tauti liittyy infektioihin tai se on perinnöllinen, jolloin HUS-oireita esiintyy toistuvasti ilman infektiota. Taudissa oikotieaktivaation säätely ei toimi. (Jarva ja Meri 2000.)

### 2.2.5 Kohtauksittainen yöllinen hemoglobinuria

Kohtauksittainen yöllinen hemoglobinuria on hankinnainen anemia, joka johtuu mutaatiosta luuytimen kantasolussa. Tällöin kaikista kantasolun jälkeläisistä puuttuvat GPI-ankkurilliset molekyylit, joihin membraanituhokompleksia estävän protektiinin (CD59) kuuluisi sitoutua. Puutteesta johtuen komplementti pystyy vaurioittamaan varsinkin tummattomia soluja, kuten punasoluja. Tämän seurauksena oireina ilmenee suonensisäistä hemolyyttistä anemiaa, verivirtsaisuutta ja laskimotukoksia. (Jarva ja Meri 2000.)

### 2.3 Komplementin määrittäminen seerumista

Komplementtipuutostutkimuksessa käytetään laskimosta saatua veren seerumia. Seerumi tulee erottaa soluista 60 minuutin kuluessa näytteenotosta. Tämä tarkoittaa, että näytteiden tulee seistä vähintään 30 minuuttia, muttei yli tuntia ennen sentrifugointia. Näytteen säilytys ja kuljetus tapahtuu +4 °C lämpötilassa. Jos näytettä joudutaan säilyttämään yli vuorokauden, se pakastetaan -20 °C:ssa ja kuljetetaan analysoitavaksi tässä lämpötilassa pakastettuna. (HUSLAB 2011). Analyysimenetelmän valmistajan mukaan seerumi tulisi pakastaa tai kuljettaa vähintään -70 °C, mutta HUSLABilla ei ole mahdollista syväjäädyttää näytteitä. Huomiotavaa on myös, että ikteria, lipemia ja hemolyysi vaikuttavat häiritsevästi näytteen analyysiin (Wieslab Complement system screen. 2010). Vaikka analyysimenetelmän valmistajan (Wieslab Complement system screen. 2010) ohjeen mukaan seerumia ei saisi sulattaa uudelleen analysoitavaksi, HUSLAB tekee näin, jos potilaan näyte alittaa klassisen tien, lektiinitien tai oikotien viitearvon. Tästä huolimatta näytteen tulokset saattavat uudelleen sulatuksen jälkeen olla viitearvoissa, siksi näytteen sulatusta yhden kerran uudelleen voidaan pitää luotettavana. (Jarva 2012.)

HUSLAB käyttää komplementtipuutosnäytteiden tutkimiseen Wieslab® complement system screen entsyymi-immunologista analysointimenetelmää (EIA). Ennen analyysiä näytteet tulee ohjeiden mukaan sulattaa suoraan pakastimesta lämpöhauteessa (+37

°C) nopeasti ja sen jälkeen välittömästi siirtää sulaneet näytteet jäähäuteelle. Tämän jälkeen seerumit pipetoidaan klassisen tien oikotien ja lektiinitien kuoppalevyille, jossa tapahtuu immunologinen reaktio (Wieslab Complement system screen. 2010).

Analyysimenetelmän periaatteena on mitata leimattujen vasta-aineiden avulla komplementin aktiivisuuden määrää, syntyneiden terminaalikompleksien (C5b-C9) neoantigeeneja. Käyttöpakkauksen levyn kuoppien pohjat on päällystetty aktivaattoreilla, joista IgM aktivoi klassista tietä, mannaani lektiinitietä ja lipopolysakkaridi (LPS ) oikotietä. Kuopissa muodostuneet komplementti-vasta-ainekompleksien määrät ovat verrannollisia komplementin aktiivisuuteen. Aktiivisuutta mitataan Labsystems iEMS Reader MF-fotometrillä 405 nm aallonpituudella, jossa komplementin mittauksessa muodostuneen absorbanssin värin intensiteetti korreloi komplementin aktiivisuutta. (Wieslab Complement system screen. 2010.)

iEMS-fotometrin tietokoneohjelma laskee tulokset prosentteina. Positiivisen kontrollin absorbanssi tulee olla >1 ja negatiivisen kontrollin absorbanssi <0.2. Fotometri vähentää taustasäteilyn kontrollien ja tutkimusnäytteiden absorbanseista, jonka jälkeen se laskee komplementin aktiivisuuden seuraavasti. (Näsman. 2012.)

$$\frac{(\text{Näytteen absorbanssi} - \text{negatiivisen kontrollin abs.})}{(\text{positiivisen kontrollin abs.} - \text{negatiivisen kontrollin abs.})} \times 100$$

HUSLABin ohjeen mukaan komplementtitutkimuksen viitearvot ovat eri aktivaatioteille seuraavat (Komplementti, puutostutkimus. 2011):

S -CH100CI yli 74 %

S -CH100AI yli 39 %

S -CH100L yli 10 %

Alentunut arvo viittaa siihen, että komplementin komponentteja on aktivaatiossa kuluttettu. Tämä johtuu siitä, että komplementti on saattanut aktivoitua ja siten kulua mahdollisen sairauden johdosta. Tällöin voidaan tehdä lisätutkimuksia komplementin yksittäisille tekijöille. (Wieslab Complement system screen. 2010.) Komplementtipuutostutkimuksen tulkintaa havainnollistaa taulukko 1.

Taulukko 1. Komplementtipuutostutkimuksen tulkinta (Näsman. 2012).

Komplementin aktiivisuus alle viitearvojen K=klassinen tie, O=oikotie, L=lektiinitie	Komplementin komponentin/säätelijätekijän puute
K	C1
K, L	C2, C4
L	MBL, MASP
O	properdiini, tekijät B, H, I
K, O, L	C3, C5-C9

### 3 Aikaisemmat tutkimukset

Opinnäytteessäni tutkin komplementin klassisen-, lektiini- ja oikotien aktiivisuuden säilyvyyttä seerumissa. Tutkittua tietoa löytyy vähän aiheesta, kuinka komplementinäytteen säilytyksen suhteen tulisi toimia (Lachmann. 2009). Löysin yhden tutkimuksen, jossa oli hieman samankaltaisuutta opinnäytetyöni kanssa: Mollnes, Garred ja Bergseth (1988) testasivat tutkimuksessaan komplementin komponentin C3 ja loppuvaiheen terminaalikompleksin, MAC:in (membraaneja tuhoava kompleksi) pitoisuuksia erilaisissa olosuhteissa. Näytteiden säilyvyyttä testattiin ja vertailtiin seerumi-, hepariini-, sitraatti- ja EDTA-putkissa. Koehenkilöinä toimivat kuusi tervettä verenluovuttajaa. Hepariini-, sitraatti- ja EDTA-putkien analyysit tehtiin plasmasta. Kaikki muut näytteet sentrifugoitiin näytteenoton jälkeen, paitsi seeruminäyte. Kaikki näytteet laitettiin edellä mainitun käsittelyn jälkeen syväjähän (-70 °C). Näytteitä pakastettiin ja sulatettiin toistuvasti 10 päivän aikana +4 °C ja +37 °C lämpötilaolosuhteissa. Analysointi suoritettiin entsyymi-immunologisella analyysimenetelmällä (EIA).

Tutkimuksen tulokset osoittavat, että uudelleen sulatus ja korkea lämpötila vaikuttavat komplementin aktivoitumiseen näyteputkessa: on syytä säilyttää näytettä matalassa lämpötilassa, jolloin näytteen komplementin spontaani aktivaatio estyy. Näyte tulee jäädyttää +4 °C:een välittömästi näytteenoton jälkeen. Verestä eroteltu plasma säilytetään +4 °C:ssa ennen syväjäädystä (-70 °C), jonka tulee tapahtua kahdeksan tunnin sisällä. Mikäli näytteen säilytyslämpötila (+4 °C) nousee, komplementti aktivoituu nopeasti. Tulosten mukaan näytettä voi sulattaa +4 °C:een ja syväjäädystä -70 °C:een useamman kerran ilman, että MAC:n pitoisuus merkittävästi nousee näytteessä. Tutkimuksen mukaan EDTA-putkesta eroteltu plasma soveltuu parhaiten komplementtitutkimuksiin, sillä EDTA-antikoagulantti ehkäisee komplementin MAC:n aktivoitumista.

Mollnesin, Garredin ja Bergsethin (1988) tutkimuksessa oli tavoitteena tutkia plasmas-  
sa tapahtuvaa komplementtiaktivaatiota, joka on jo tapahtunut elimistössä. Opinnäyte-  
työssäni taas tutkin komplementin aktivaatiota seerumissa, jonka on tarkoitus tapahtua  
näytteen analyysivaiheen aikana. Näyteputkien antikoagulanteilla on komplementtia  
estävä vaikutus (Seelen ym. 2004), eivätkä antikoagulanttiputket ole siten soveltuvia  
Wieslab® complement system screen EIA-menetelmään. Mollnesin, Garredin ja Berg-  
sethin (1988) tutkimuksen lähtökohta on siten erilainen, eikä se ole verrannollinen  
opinnäytetyöhöni.

#### 4 Työn tarkoitus ja työtä ohjaavat kysymykset

Opinnäytetyöni tarkoituksena on selvittää, kuinka komplementin klassisen tien lek-  
tiinitien ja oikotien aktiivisuudet säilyvät seerumissa erilaisissa lämpötilaolosuhteissa.  
Aikaisempien tutkimusten puutteen vuoksi HUSLAB kaipaa aiheesta ajankohtaista tie-  
toa. Tutkin myös, soveltuuko seerumigeeliputken käyttö komplementtianalyysiin. Ver-  
taan, kuinka eri tavalla (B, C, D, E, F, G, H, I) säilytettyjen näytteiden tulokset poikkeaa-  
vat näytesarjasta A, jota on käsitelty HUSLAB:n ohjeiden (HUSLAB. 2011) mukaisesti  
pakastamalla (-20 °C) näyte suoraan sentrifugoinnin jälkeen.

##### 4.1 Komplementtiaktiivisuuden säilyvyys jääkaapissa ja huoneenlämmössä

Näyte on seerumiputkessa, joka sentrifugoidaan tunnin kuluessa näytteenotosta ja  
seerumi erotellaan soluista sentrifugoinnin jälkeen. Seerumi jaetaan neljään eppendorf-  
putkeen (A, B, C ja D). Kuinka näyte säilyy, kun se tämän jälkeen

A) pakastetaan heti (-20 °C)?

B) säilytetään vuorokausi jääkaapissa (+4 °C), jonka jälkeen se pakastetaan (-20 °C)?

C) säilytetään huoneenlämmössä (+21 °C) vuorokausi, jonka jälkeen se pakastetaan (-  
20 °C)?

D) säilytetään kolme yötä jääkaapissa (+4 °C), jonka jälkeen pakastetaan (-20 °C)?

Komplementtipuutosnäytteet sentrifugoidaan nykyisten ohjeiden mukaisesti tunnin (30-  
60 min) kuluessa. HUSLAB:n käytäntönä on mieluiten pakastaa näyte heti sentrifu-

goinnin jälkeen (A) tai säilyttää sitä enintään vuorokausi jääkaapissa (B), jotta komplementti ei pääse aktivoitumaan. (HUSLAB 2011.)

Selvitän näytteiden säilyvyyttä huoneenlämmössä (+21 °C) vuorokauden ja jääkaapissa (+4 °C) kolme yötä ennen pakastusta. Komplementtinäyte pitää poikkeuksellisesti muihin näytteisiin nähden pakastaa mahdollisimman pian. Pyyntöjä komplementtinäytteistä tulee näytteenottolaboratorioon harvakseltaan, jolloin näytteenottolaboratoriossa ei aina muisteta pakastaa näitä näytteitä. Komplementtinäyte saattaa unohtua viikonlopun yli jääkaappiin, jolloin näytteen komplementtiaktiivisuus saattaa muuttua. (Jarva 2012.) Selvitän opinnäytetyössäni, kuinka tämä vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.

#### 4.2 Seisotusajan vaikutus ennen sentrifugointia komplementtiaktiivisuuteen

Näyte on seerumiputkessa, joka sentrifugoidaan kahden tunnin (1,5-2 h) kuluessa näytteenotosta ja seerumi erotellaan soluista sentrifugoinnin jälkeen kahteen eppendorf-putkeen E ja F. Kuinka näyte säilyy, kun se tämän jälkeen

E) pakastetaan heti (-20 °C)?

F) säilytetään kolme yötä jääkaapissa (+4 °C), jonka jälkeen pakastetaan (-20 °C)?

Helsingin yliopiston mukaan komplementtipuutosnäyte voidaan sentrifugoida kahden tunnin kuluessa näytteenotosta. Helsingin yliopistolla ohjeena on, että komplementtipuutosnäyte voi odottaa enintään kaksi tuntia ennen sentrifugointia. Epäselvää on, mihin tämä tieto perustuu; onko aiheellista seisottaa näytettä kahta tuntia, ja vaikuttaako seisotus komplementin aktivaatioon. (Jarva 2012.) Sen takia selvitän kohdan E) ja F) mukaisesti, kuinka näytteen kahden tunnin seisotus ennen sentrifugointia vaikuttaa tuloksiin.

#### 4.3 Komplementtiaktiivisuuden säilyminen +37 °C:een lämpötilaolosuhteissa

Näyte on seerumiputkessa, jota säilytetään +37 °C:ssa tunti ennen sentrifugointia. Tämän jälkeen näyte sentrifugoidaan +37 °C:ssa ja seerumi erotellaan soluista eppendorf-putkiin G ja H. Kuinka näyte säilyy, kun se tämän jälkeen

G) pakastetaan (-20 °C) heti?

H) pakastetaan (-20 °C) heti ja sulatetaan huoneenlämmössä (+21 °C) tunti, jonka jälkeen se pakastetaan uudelleen (-20 °C)?

Selvitän, kuinka komplementtipuutosnäyte säilyy +37 °C lämpötilassa. Tarkoituksena on saada selville, onko kryoglobuliini- ja komplementtinäytteitä mahdollista määrittää samasta näyteputkesta. Kryoglobuliinit ovat yleensä immunoglobuliineja tai immunokomplekseja, jotka saostuvat tai muodostavat geelin, mikäli seerumin tai plasman lämpötila laskee alle +37 °C (OYSLAB 2010). Kryoglobuliinien saostuminen kylmässä saattaa aiheuttaa pienten verisuonten tukoksia elimistön periferiassa, jossa lämpötila on matalampi kuin muualla elimistössä (Maha-suoli-sanakirja 2012). Kryoglobulinemia liittyy tavallisesti autoimmuunisairauksiin ja paraproteinemiaan sekä joihinkin virusinfektioihin, mutta se voi olla myös itsenäinen, hyvänlaatuinen ilmiö. Terveen henkilön näyte ei viitearvojen mukaan sisällä kryoglobuliinia (OYSLAB 2010).

Ongelmana on, että kryoglobuliinia sisältävä näyte aktivoi komplementtia voimakkaasti kylmissä olosuhteissa. Lämpimissä olosuhteissa säilytettynä kryoglobuliini ei kuluta komplementtia (Lachmann. 2009). Ohjeiden mukaan komplementtipuutosnäytettä taas tulisi säilyttää vain kylmissä olosuhteissa, sillä lämpimissä olosuhteissa komplementti aktivoituu (HUSLAB 2011; Wieslab Complement system screen 2010). Tämän vuoksi, kuten edellä mainittiin kryoglobuliininäytettä tulee säilyttää +37 °C:ssa, alhaisempi lämpötila ei ole suotavaa kryoglobulinemianäytteen analyysin kannalta (OYSLAB 2010).

#### 4.4 Seerumigeeliputken soveltuvuus komplementtitutkimukseen

Näyte on seerumigeeliputkessa (I), joka sentrifugoidaan tunnin kuluessa näytteenotosta. Seerumia ei siirretä eppendorf-putkeen. Kuinka komplementtiaktiivisuus säilyy seerumissa, kun se pakastetaan geeliputkessa (-20 °C)?

Nykyisin seerumit erotellaan lisäaineettomasta seerumiputkesta (BD Vacutainer®) toiseen tyhjään putkeen. Tämä lisää työvaiheita ja voi aiheuttaa näytteen kontaminaatiota, jolloin näytteen laatu kärsii. Kun käytössä olisi vain geeliputki, ei näytteitä tarvitsisi erotella, sillä geeli eristää tutkittavan seerumin veren muista komponenteista. Näytettä voisi pipetoida geeliputkesta suoraan analysoitavaksi, jolloin vähennettäisiin työvaiheita ja näin säästettäisiin aikaa.



## 5 Opinnäytetyön toteutus

Suoritin opinnäytetyöni käytännön osuuden HUSLABin immunologian laboratoriossa Helsingissä kahden viikon aikana keväällä 2012. Ensimmäinen viikko sisälsi tutkimukseni verinäytteiden oton ja näytteiden käsittelyn (liite 1), tutustumisen Wieslab® complement system screen-entsyymi-immunologiseen menetelmään yhdessä bioanalytiikon kanssa rutiinityöskentelyssä sekä itsenäisen harjoitussarjan suorituksen. Seuraavalla viikolla analysoin tutkimukseni näytteet, kun tutkimuksen suoritus oli minulle jo tuttua.

Otin verinäytteet opinnäytetyötäni varten kymmeneltä (n=10) vapaaehtoiselta ja terveeltä laboratorion työntekijältä. Poikkeuksena oli, että yhdellä koehenkilöstä oli tiedossa synnynnäinen lektiinitien puutos. Sain opinnäytetyötäni varten HUSLABilta tutkimusluvan. Olen käsitellyt jokaisen koehenkilön tulokset luottamuksellisesti tässä raportissa. Kultakin koehenkilöiltä keräsin verta kolme seerumiputkea (BD Vacutainer®, 5 ml) ja yhden seerumigeeliputken (BD Vacutainer®, 5 ml). Siirrostin näistä näyteputkista seerumit eppendorf-putkiin suunnitelmani mukaan (liite 1) seerumigeeliputkea lukuunottamatta. Yhteensä eri tavalla käsiteltyjä seeruminäytteitä sain yhdeltä henkilöltä yhteensä yhdeksän kappaletta. Kaiken kaikkiaan näytteiden yhteismääräksi tuli yhteensä 90 kappaletta. Sovitun säilytysajan ja -tavan (liite 1) jälkeen siirsin kaikki näytteet pakastimeen (-20 °C), josta sulatin ne klassisen- oiko- ja lektiinitien aktiivisuuksien mittausta varten.

Ohjaava laboratoriohoitaja huolehti näytteiden identifioimisesta nimitarroin ja viemällä välittömästi lämpökäsittelyä vaativat näytteet lämpökaappiin (+37 °C) odottamaan sentrifugointia, kun itse keskityin näytteenottoon. Kunkin näytteen kohdalle merkitsin näytteenoton kellonajan. Näin pystyttiin kontrolloimaan, että kaikki näytteet odottivat suunnitellun ajan ennen sentrifugointia. Näytteet A, B, C, D, G, H ja I seisoivat vähintään 30 minuuttia, mutteivät yli tuntia. Näytteet E ja F seisoivat vähintään tunnin ja 30 minuuttia, muttei enempää, kuin kaksi tuntia. Suoritin näytteenoton kahdessa erässä, jotta ehdin sentrifugoida näytteet ajoissa ja niiden seisotusaika varmasti pysyi edellä mainituissa rajoissa.

Sentrifugoinnin jälkeen jaoin seerumit identifioituihin eppendorf-putkiin seerumigeeliputkia lukuun ottamatta sekä siirsin näytteet jääkaappiin, pakastimeen tai huoneenläm-

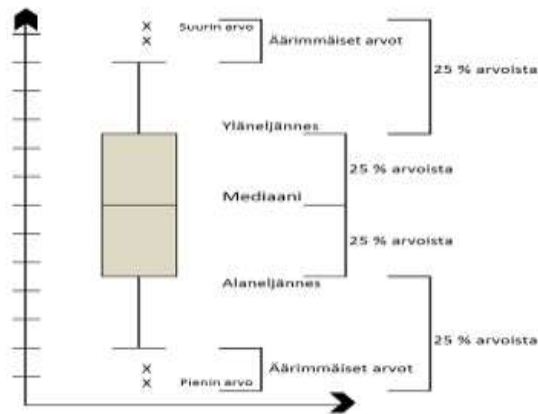
pöön tavoitteiden mukaisesti (liite 1). Tarkastin näytteet silmänmääräisesti lipemian, ikterian ja hemolyysin osalta ja kirjasin poikkeavat näytteet muistiin.

HUSLAB käyttää komplementtipuutosnäytteiden tutkimiseen Wieslab® complement system screen entsyymi-immunologista analysointimenetelmää (EIA), jolla suoritin opinnäytetyöni näytteiden analysoinnin iEMS-fotometriä käyttäen. Ennen analyysiä näytteet tulee ohjeiden mukaan sulattaa suoraan pakastimesta +37 °C lämpöhauteessa nopeasti ja sen jälkeen laittaa välittömästi sulaneet näytteet jäähauteelle. Analyysivaiheeseen perehdyttävän bioanalyytikon suosituksesta ymmärsin kuitenkin, että näytteiden olisi parempi sulaa huoneenlämmössä, sillä +37 °C lämpötila saattaisi aktivoida komplementtia. Näytemäärät olivat myös niin pieniä eppendorf-putkissa, jolloin lämpöhaude olisi voinut lämmittää liikaa seerumia.

Annoin näytteiden siis sulaa huoneenlämmössä ja laitoin näytteen heti jäähauteelle kun seerumissa vähääkään näkyi sulamisen merkkejä. Sulatin kaikki näytteet tällä tavoin, paitsi seerumigeeliputket laitoin lämpöhauteeseen (+37 °C), sillä toiselta taholta kuulin myöhemmin, että lämpöhaude olisi huoneenlämpöä parempi vaihtoehto sulattaa näytteet. Geeliputkessa on seerumin lisäksi myös geeli, joten se sulaa hitaammin ja näyte olisi joutunut sulamaan kauemmin huoneenlämmössä. On tärkeää saada näytteet nopeasti jäähauteeseen. Siksi päätin ohjaajani kanssa sulattaa geeliputket lämpöhauteessa (+37 °C).

## 6 Tulokset

Olen määrittänyt klassisen-, lektiini- ja oikotien tulokset samalla tavoin. Tulosten arvioinnissa käytän laatikkojana-kuviota, mediaania, p-arvoa ja eroprosenttia. Valitsin laatikkojana-kuvion (kuvio 2), koska se on havainnollinen esitystapa tarkasteltaessa monen eri muuttujan jakauman sijaintia ja hajontaa, sekä sopii käyttöön erityisesti silloin, kun muuttuja saa paljon eri arvoja. Laatikkojana-kuvio perustuu tunnuslukuihin, jotka jakavat tarkasteltavan ryhmän neljään yhtä suureen joukkoon.



Kuvio 2. Laatikkojana-kuvio (Muuttujien kuvaaminen 2012).

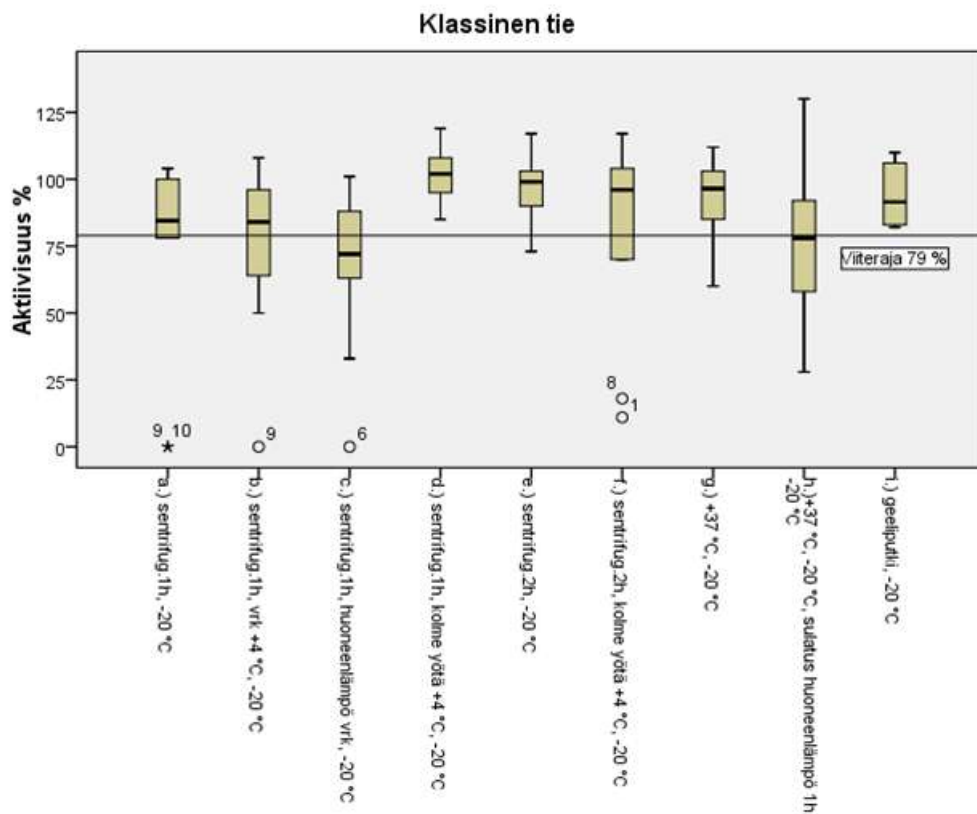
Tunnusluvut ovat minimi, alaneljännes, mediaani, ylaneljännes ja maksimi. Tilasto-ohjelma voi merkitä todelliset minimi ja maksimi erityismerkillä, kun arvo poikkeaa muista oleellisesti. (Laatikkojana-kuvio 2004.) Käyttämäni tilasto-ohjelma ilmoittaa tähti- ja pallo-kuvioin koehenkilön numerolla näytteet, jotka poikkeavat äärimmäisesti näytesarjaan nähden.

Arvioin mediaanin avulla näytesarjojen keskimääräistä onnistumista. Käytän mediaania, koska sen erityinen hyöty keskilukuna on, että siihen eivät vaikuta muista muuttujan arvoista huomattavasti poikkeavat suuret tai pienet arvot, toisin kuin keskiarvossa (Keskiluvut 2003). Tutkimuksessani on useita yksittäisiä näytteitä, joiden tulokset ovat epäonnistuneet, alle viitearvojen. Olen huomioinut tilastollisessa analyysissä myös nämä näytteet. Suoritin uudelleen klassisen tien lektiinitien ja oikotien aktiivisuuspitoisuuksien määrittämiseksi näytesarjoille A ja B (liite 1), sillä näissä näytesarjoissa kaksi samaa koehenkilöä saivat tuloksen 0 kaikkien aktiivisuusreittien (klassinen tie lektiinitie ja oikotie) testeissä. Olen valinnut tilastolliseen analyysiin paremmin onnistuneet tulokset joko alkuperäisistä (A1, B1, liitteessä 2) tai uudemmista (A2, B2, liitteessä 2) näytesarjoista.

Vertaan, kuinka monta prosenttia näytesarja A (liite 1) poikkeaa muista näytesarjoista klassisestien, lektiinitien ja oikotien testeissä. Näytesarja A on käsitelty HUSLAB:n yleisen käytännön mukaisesti, johon verrataan epätavallisesti (B, C, E, F, G, H ja I, liitteessä 1) käsiteltyjä näytesarjoja. Arvioin poikkeavuuksien tilastollista merkitsevyyttä p-arvolla. P-arvo ilmoittaa virheellisen päätelmän todennäköisyyden. Jos p-arvo on alle 0,05, voidaan tulosta pitää tilastollisesti merkitsevänä. (Taanila 2012.)

## 6.1 Klassisen tien säilyvyyden tulokset

Arvioin klassisen tien tuloksia kuviossa 3. Näyttää siltä, että klassisen tien pitoisuus jopa paranee, kun näytteitä (sarjat E ja F) on seisoitettu kaksi tuntia huoneenlämmössä ennen sentrifugointia verrattuna näytteisiin, joita on seisoitettu tunti (sarjat A, B, ja C). Näytteet myös säilyvät hyvin, kun niitä on säilytetty jääkaapissa (+4 °C) 1-3 vuorokautta heti sentrifugoinnin jälkeen. Myös geeliputkessa klassisen tien pitoisuus säilyy erinomaisesti, sillä näytesarjassa I ei ole yhtäkään viitearvon alittavaa tulosta. Näytesarjan C näytteitä on seisoitettu vuorokausi huoneenlämmössä sentrifugoinnin jälkeen ennen pakastusta. Tämä näytesarja on klassisen tien kaikista epäonnistunein, huonoiten säilyvä verrattuna muiden näytesarjojen mediaaneihin. Klassisen tien aktiivisuus säilyy näytesarjoissa G ja H. Näytesarja H:n mediaani on tosin matalampi, kuin näytesarja G:n. Tästä voidaan päätellä, että sulatus aktivoi klassista tietä ja tuloksesta tulee siten matalampi.



Kuvio 3. Klassisen tien säilyvyyden tulokset (n=10)

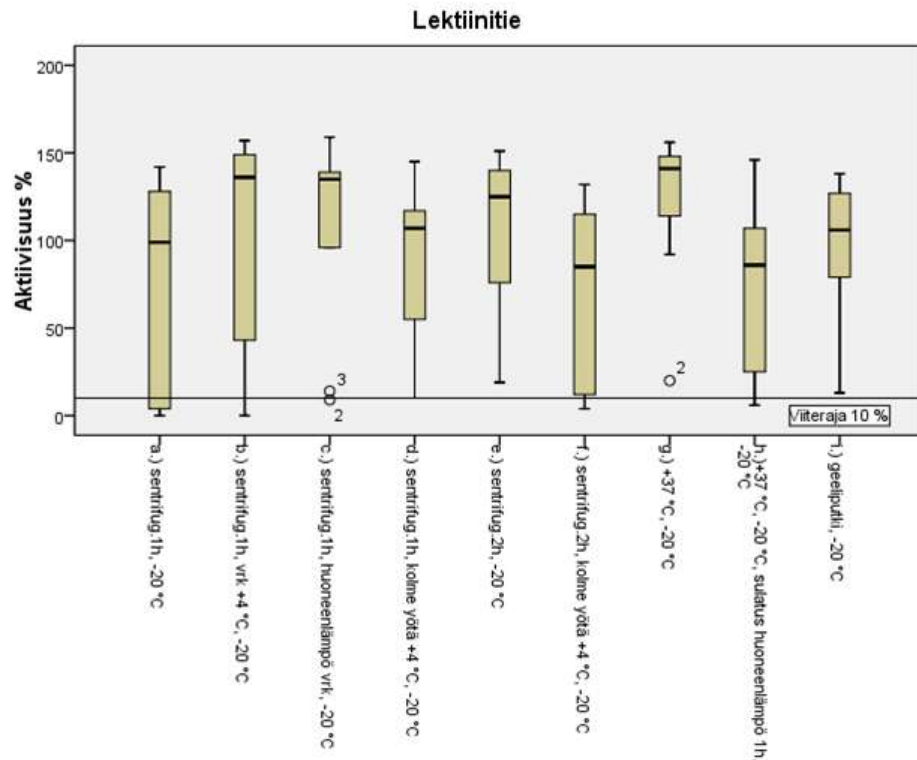
Näytesarjat D (+20,7 %), E (+17,2 %), F (+13,6 %), G (+14,2 %) ja I (+8,3 %) eroavat ilmoitetun prosentin verran näytesarjasta A: näytesarja A on epäonnistuneemmin säilynyt muihin näytesarjoihin nähden. Näytesarjat B (-0,6 %), C (-14,8 %) ja H (-7,7 %) säilyvät huonommin näytesarjaan A verrattuna. Tilastollisesti merkitsevästi näytesarjasta A poikkeaa huonoiten säilyvä näytesarja C (p-arvo 0,031) ja parhaiten säilyvä näytesarja D (p-arvo 0,016). (Taulukko 2)

Taulukko 2. Klassisen tien säilyvyyden tulokset

	a.	b.	c.	d.	e.	f.	g.	h.	i.
N=10									
Mediaani	84.50	84.00	72.00	102.00	99.00	96.00	96.50	78.00	91.50
Minimi	0	0	0	85	73	11	60	28	82
Maksimi	104	108	101	119	117	117	112	130	110
P-arvo		0,398	0,031	0,016	0,445	0,820	0,352	0,156	0,211
Ero %		-0,6	-14,8	+20,7	+17,2	+13,6	+14,2	-7,7	+8,3

## 6.2 Lektiinitien säilyvyyden tulokset

Arvioin lektiinitien tuloksia kuviossa 4. Mukana on yhdeksän (n=9) koehenkilöä, sillä yhdellä koehenkilöllä on todettu synnynnäinen lektiinitien puutos. Lektiinitien pitoisuus säilyy hyvin, riippumatta siitä säilytetäänkö näytteitä tunti tai kaksi huoneenlämmössä ennen sentrifugointia. Tosin näytesarja F, jota on seisotettu kaksi tuntia huoneenlämmössä ennen sentrifugointia, säilyy huonommin, kuin yhdenmukaisesti säilytetty näytesarja D, jota on seisotettu tunti. Tulosten mukaan näytteet säilyvät hyvin, kun niitä on säilytetty jääkaapissa (+4 °C) 1-3 vuorokautta tai vuorokausi huoneenlämmössä heti sentrifugoinnin jälkeen. Myös geeliputkessa lektiinitien pitoisuus säilyy erinomaisesti, sillä näytesarjassa I ei ole yhtäkään viitearvon alittavaa tulosta. Lektiinitien aktiivisuus säilyy näytesarjoissa G ja H. Näytesarja H:n mediaani on matalampi, kuin näytesarja G:n. Tästä voidaan päätellä, että sulatus aktivoi lektiinitietä ja tuloksesta tulee siten matalampi.



Kuvio 4. Lektiinitien säilyvyyden tulokset (n=9)

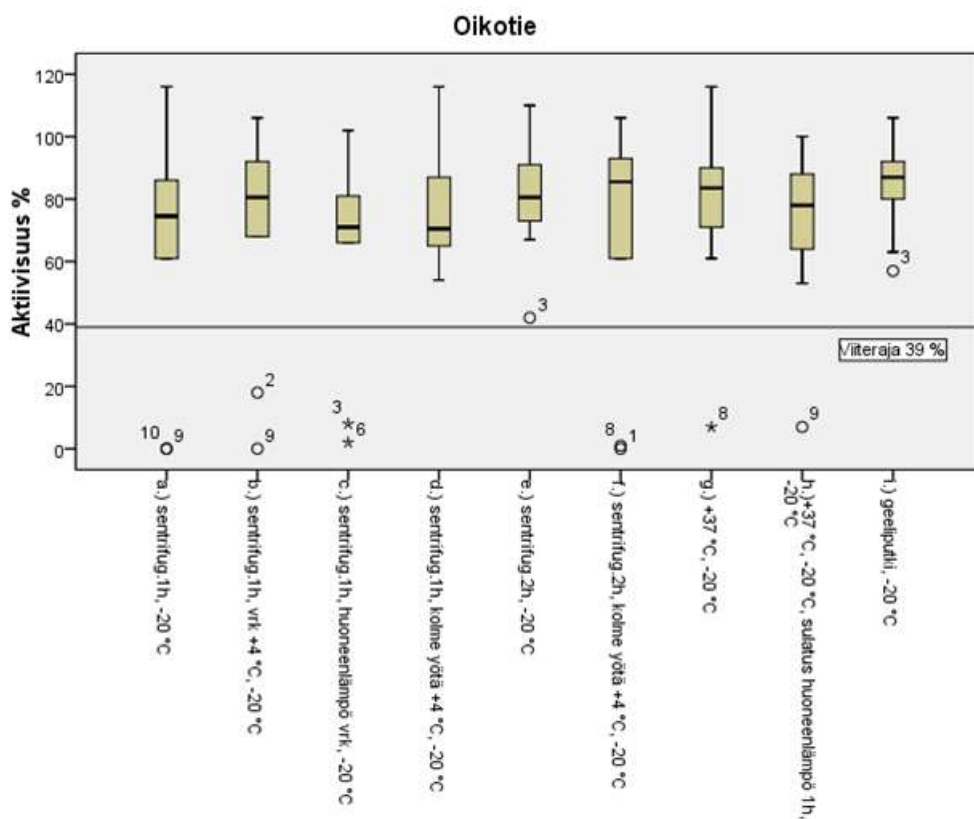
Näytesarjat B (+ 37 %), C (+36 %), D (+8,1 %), E (+26 %), G (+42,4 %) ja I (+7,1 %) eroavat ilmoitetun prosentin verran näytesarjasta A: näytesarja A on epäonnistuneemmin säilynyt muihin näytesarjoihin nähden. Näytesarjat F (-14,1 %) ja H (-13,1 %) säilyvät huonommin näytesarjaan A verrattuna. Lektiinitien testissä mikään näytesarja ei poikkea tilastollisesti merkitsevästi näytesarja A verrattuna. (Taulukko 3)

Taulukko 3. Lektiinitien säilyvyyden tulokset

	a.	b.	c.	d.	e.	f.	g.	h.	i.
N=9									
Mediaani	99.00	136.00	135.00	107.00	125.00	85.00	141.00	86.00	106.00
Minimi	0	0	9	10	19	4	20	6	13
Maksimi	142	157	159	145	151	132	156	146	138
P-arvo		0,844	0,688	0,219	0,438	0,078	0,109	0,078	0,156
Ero %		+ 37,4	+ 36,4	+8,1	+ 26,3	- 14,1	+42,4	-13,1	+7,1

### 6.3 Oikotien säilyvyyden tulokset

Arvioin oikotien tuloksia kuviossa 5. Oikotien pitoisuus säilyi hyvin, kun näytteitä on säilytetty tunti tai kaksi huoneenlämmössä (+21 °C) ennen sentrifugointia. Oikotien pitoisuus on jopa korkeampi, kun näytteitä (sarjat E ja F) on seisotettu kaksi tuntia huoneenlämmössä (+21 °C) ennen sentrifugointia verrattuna näytteisiin, joita on seisotettu tunti (sarjat A, B, C ja D). Tulosten mukaan näytteet säilyivät hyvin kun niitä on säilytetty jääkaapissa (+4 °C) 1-3 vuorokautta tai vuorokausi huoneenlämmössä (+21 °C) heti sentrifugoinnin jälkeen. Myös geeliputkessa oikotien pitoisuus säilyi erinomaisesti, sillä näytesarjassa I ei ole yhtäkään viitearvon alittavaa tulosta. Oikotien aktiivisuus säilyi näytesarjassa G ja H. Näytesarja H:n mediaani on matalampi, kuin näytesarja G:n. Tästä voidaan päätellä, että sulatus aktivoi oikotietä ja tuloksesta tulee siten matalampi.



Kuvio 5. Oikotien säilyvyyden tulokset

Näytesarjat B (+8,1 %), E (+8,1 %), F (+14,8 %), G (+12,1), H (+4,7 %) ja I (+16,8) eroavat ilmoitetun prosentin verran näytesarjasta A: näytesarja A on epäonnistuneemmin säilynyt muihin näytesarjoihin nähden. Näytesarjat C (-4,7 %) ja D (-5,4 %) ovat huomommin säilyneitä näytesarjaan A verrattuna. Oikotien testissä mikään näytesarja ei poikkea tilastollisesti merkitsevästi näytesarja A verrattuna. (Taulukko 4.)

Taulukko 4. Oikotien säilyvyyden tulokset

	a.	b.	c.	d.	e.	f.	g.	h.	i.
N=10									
Mediaani	74.50	80.50	71.00	70.50	80.50	85.50	83.50	78.00	87.00
Minimi	0	0	2	54	42	0	7	7	57
Maksimi	116	106	102	116	110	106	116	100	106
P-arvo		0,867	0,078	0,008	0,609	1,000	0,875	0,297	0,984
Ero %		+8,1	-4,7	-5,4	+ 8,1	+14,8	+12,1	+4,7	+16,8

#### 6.4 Yhteenveto tuloksista

Tuloksissa havaitaan useita yksittäisiä heikosti säilyneitä poikkeamia osassa näytesarjoista. Siitä huolimatta kaikki klassisen tien, oikotien ja lektiinitien näytesarjat ovat mediaanien mukaan keskimäärin onnistuneesti säilyneitä, sillä suurin osa tuloksista ylittää viitearvot. Parhaiten ovat säilyneet lektiinitien (n=9, viitearvo 10 aktiivisuus %) ja oikotien (n=10, viitearvo 39 aktiivisuus %) näytteet, joissa molemmissa 89 % näytesarjojen näytteistä ylittää viitearvot. Klassisessa tiessä (n=10, viitearvo 79 aktiivisuus %) näytesarjojen tuloksista 73 % ylittää klassisen tien viitearvon. Tulosten perusteella klassisen tien, oikotien ja lektiinitien aktiivisuudet säilyvät HUSLAB:n ohjeista poikkeavissa olosuhteissa, joita on testattu näytesarjoissa B, C, D, E, F, H ja I. Ainoastaan huonoiten säilynyt näytesarja C poikkeaa tilastollisesti merkitsevästi (p-arvo 0,031) sekä parhaiten säilynyt näytesarja D (p-arvo 0,016) HUSLAB:n ohjeiden mukaisesti käsitellystä A-näytesarjasta klassisen tien tuloksissa.



## 7 Pohdinta tulosten luotettavuudesta

Opinnäytetyöni komplementin klassisen tien, lektiinitien ja oikotien näytesarjat säilyvät keskimäärin hyvin liitteen 1 mukaisissa olosuhteissa. Tulosten luotettavuuden osalta pohdin, minkälaiset virhelähteet ovat voineet vaikuttaa satunnaisiin epäonnistuneisiin näytteisiin. Lopuksi arvioin tulosten käyttökelpoisuutta.

### 7.1 Satunnaisesti epäonnistuneet tulokset

Lähes kaikissa näytesarjoissa esiintyy satunnaisia yksittäisiä viitearvon alittavia tuloksia. Erityisen silmiinpistävää on, että kaksi näytettä (näytenumerot 9 ja 10) ovat saaneet komplementtitestien uusinnosta huolimatta arvot 0 kaikkien aktiivisuusreittien A ja B-sarjoissa (liite 2), vaikka nämä näytesarjat on käsitelty HUSLABin ohjeiden (HUSLAB 2011) mukaisesti. Näytesarjalta A erityisesti odotin onnistuneita tuloksia, sillä tämä näytesarja pakastettiin oikeaoppisesti heti tunnin seisotuksen ja sentrifugoinnin jälkeen, jolloin komplementin ei pitäisi ehtiä aktivoitua (Näsman. 2012).

Suoritin uusinnat alkuperäisistä A ja B-sarjojen näytteistä, joita säilytin pakastimessa (-20 °C). Uudet tulokset olivat osittain sulattamisesta huolimatta jopa alkuperäisiä tuloksia parempia. Tämä tukee käsitystä komplementtiarvon häilyvyydestä (Jarva 2012). Ohjeissa (HUSLAB 2011; Wieslab Complement system screen. 2010) ei suositella komplementtinäytteen uudelleen pakastusta ja sulatusta, mutta HUSLAB:lla näin silti tehdään, kun halutaan uudelleen määrittää potilaan komplementtipitoisuus. Henkilökunnan kokemuksen mukaan tulokset saattavat jopa parantua, kun sama näyte analysoidaan uudelleen sulatettuna (Jarva 2012). Tulokseni uusintänäytteistä tukevat tätä käsitystä.

Tulokset olisivat olleet luotettavampia, jos olisin tehnyt näytteistä rinnakkaismääritykset samaan aikaan ja määrittänyt komplementin lähtötason (ns. 0-näyte) heti sentrifugoinnin jälkeen ennen näytteiden pakastusta. Tällöin näytteiden määrä olisi nelinkertaistunut. Resurssikysymyksenä tämä ei ollut HUSLAB:lla mahdollista.

## 7.2 Seerumin sulatus

Käyttövalmisteeseen mukaan (Wieslab Complement system screen. 2010) komplementtinäytteet olisi pitänyt sulattaa nopeasti ennen jäähauteeseen laittoa. HUSLAB:n ohjeiden mukaan tämä tarkoittaa, että näytteet sulatetaan nopeasti lämpölevyllä (+37 °C) ennen jäähauteeseen asettamista (HUSLAB 2011). Näin en ohjaajani kanssa kuitenkaan päättänyt tehdä, kuin ainoastaan näytesarjan I kohdalla, jossa seerumit olivat geeliputkissa. Geeliputkien sisällön sulamisessa olisi kestänyt huoneenlämmössä liian kauan, jolloin komplementti olisi ehtinyt ei-toivotusti aktivoitua. Geeliputkissa olevien näytteiden tuloksista yksikään ei ollut alle viitearvojen missään komplementtireitissä. Tämän perusteella näyttäisi kannattavalta sulattaa seerumit lämpöhauteessa (+37 °C).

## 7.3 Seerumin pipetointi

Seeruminäytteiden pipetoinnissa kuoppalevyille analyysiä varten on saattanut käydä niin, etten ole pipetoinut riittävää määrää näytettä kuoppaan huolellisesta työskentelystäni huolimatta. Pipetoitava määrä oli pieni, vain 2,5 µl kuoppalevyä kohden. Tämä määrä pipetoidaan laimennusliuokseen. Normaalisti pipetointimäärä on puolet suurempi, mutta sovin ohjaajani kanssa, että pipetoin pienemmän määrän reagensseja säästäkseni. Silmämääräisesti oli vaikeaa havaita, että kaikki tarvittava näytemäärä menee kuoppaan pipetin kärjestä

## 7.4 Muut virhelähteet

Kahden koehenkilön (näytenumerot 1 ja 2) näytteissä esiintyi hemolyysiä. Sovin ohjaajani kanssa, että otan näytteet mukaan komplementin analyysiin hemolyysistä huolimatta. Käyttövalmisteeseen mukaan hemolyysi häiritsee näytteen analyysiä (Wieslab Complement system screen. 2010). Koehenkilö 1:n seerumiputkessa 3. (liite 1) esiintyi hemolyysiä ja koehenkilö 2:n kaikissa näyteputkissa esiintyi sitä. Hemolyysistä huolimatta kyseisten koehenkilöiden tulokset ovat keskimäärin onnistuneita, sillä satunnaisia epäonnistuneita tuloksia havaitaan monen muunkin koehenkilön kohdalla.

Käyttövalmisteeseen ohjeen (Wieslab Complement system screen. 2010) mukaan komplementtinäytteen seerumi tulisi sentrifugoinnin jälkeen välittömästi syväjäädäyttää (-70 °C). HUSLAB:lla ei ole mahdollisuutta syväjäädäyttää näytteitä. Näytteiden säilytys ta-

pahtuu pakastimessa (-20 °C) (HUSLAB 2011). Tulosteni mukaan komplementti säilyy kuitenkin hyvin, vaikka näytteitä säilytetään pakastimessa (-20 °C). Tuloksissani on kuitenkin useita satunnaisia, epäonnistuneita arvoja. Saattaa olla mahdollista, että kaikkien ihmisten komplementit eivät säily samanlaisissa olosuhteissa vaan joidenkin komplementti aktivoituu lämmössä herkemmin, kuin toisten.

## 7.5 Tulosten käyttökelpoisuus

Opinnäytetyöni tulosten perusteella komplementin klassisen tien, lektiinitien ja oikotien aktiivisuus säilyy liitteen 1 mukaisesti säilytetyissä olosuhteissa. Yksittäisiä epäonnistuneita tuloksia esiintyy jokaisen komplementin aktiivisuusreitin tutkimuksessa, mutta mediaanien mukaan komplementti säilyy keskimäärin hyvin kaikissa näytesarjoissa. Ainoastaan klassisen tien näytesarjoista huonoiten säilynyt C (p-arvo 0,031) ja parhaiten säilynyt D (p-arvo 0,016) poikkeavat tilastollisesti melkein merkitsevästi. HUSLAB:n ohjeiden mukaan säilytettyyn näytesarjaan A nähden.

Tutkimukseni mukaan klassisen tien, lektiinitien ja oikotien aktiivisuudet säilyvät seerumissa, kun näyte seisoo huoneenlämmössä (+21 °C) yhdestä kahteen tuntiin ennen sentrifugointia. Aktiivisuudet säilyvät, kun näytettä säilyttää yhdestä kolmeen vuorokauden jääkaapissa (+4 °C) tai huoneenlämmössä (+21 °C) vuorokauden ennen pakastusta (-20 °C). Klassisen tien aktiivisuus ei säily luotettavasti huoneenlämmössä säilytettynä vuorokautta. Geeliputkessa komplementtipitoisuus säilyy erinomaisesti kaikissa aktiivisuusreiteissä, kun näytettä käsitellään HUSLABin nykyisten ohjeiden mukaisesti.

Opinnäytteeni tulosteni mukaan on mahdollista tehdä komplementtianalyysi näytteestä, jota on säilytetty +37 °C:een olosuhteissa ennen pakastusta (-20 °C). Säilyvyys hieman huonontui näytesarjassa H verrattuna näytesarjaan G kaikissa komplementin aktiivisuusreiteissä. Näiden sarjojen tulokset eivät kuitenkaan poikkea tilastollisesti merkitsevästi HUSLABin ohjeiden mukaan säilytettyyn näytesarjaan A nähden.

Mikäli HUSLAB aikoo lisätä komplementtitutkimuksen (S-C-DEF) preanalyttisiin ohjeisiin jonkin tutkimani säilytysmenetelmän, kannattaa siitä minusta tehdä vielä varmuuden vuoksi uusi koesarja, jossa käytetään rinnakkaisnäytteitä. Tuloksia voidaan tällöin pitää luotettavampina. Näytteet kannattaa myös sulattaa lämpöhauteessa, kuten ohjeet suosittelevat.

## Lähteet

Heitzeneder, S. - Seidel, M. - Förster-Waldl, E. - Heitger A. 2012. Mannan-binding lectin deficiency - Good news, bad news, doesn't matter? *Clinical Immunology* 143. 22-38.

Jarva, Hanna 2012. *Erikoislääkäri*. Helsinki. Suullinen tiedonanto 20.5.

Jarva, Hanna – Meri, Seppo 2000. Kliinisesti merkittävät komplementtipuutokset. Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim*. Verkkodokumentti. <<http://tinyurl.com/7ss38vy>>. Luettu 4.2. 2012.

Jarva, Hanna - Meri, Seppo 2011: Komplementtipuutokset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 276-279.

Keskiluvut 2003. Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. Päivitetty 31.8. 2003. Verkkodokumentti. <<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/keskiluvut/keskiluvut.html#mediaani>>. Luettu 23.9.2012

Komplementti, puutostutkimus. 2011. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <[http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt\\_show.exe?assay=9035&terms=s-c-def](http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=9035&terms=s-c-def)>. Luettu 21.3. 2012.

Kryoglobuliini (kval), seerumista. 2010. Tutkimusohjekirja. OYSLAB, Oulun yliopistollinen sairaala. Verkkodokumentti. <<http://oyslab.fi/ohjekirja/2157.html>>. Luettu 19.3. 2012.

Laatikkojana-kuvio 2004. Yhteiskuntatieteellinen tietoarkisto. Päivitetty 20.9. 2004. Verkkodokumentti. <<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/kuviot/kuviot.html>>. Luettu 23.9.2012

Lachmann, P.J. 2009. Preparing serum for functional complement assays. *Journal of Immunological Methods* 352. 195-197.

Maha-suoli-sanakirja 2012. *Gastrolab*. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.3. 2012. <<http://www.gastrolab.net/dictfk.htm>>. Luettu 21.3. 2012.

Meri, Seppo 2011: Komplementtijärjestelmä. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.): *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 53-65.

Mollnes, T.E. – Garred, P. – Bergseth G. 1988. Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clinical experimental Immunology* 73. 484-488.

Muuttujien kuvaaminen 2012. Oulun yliopisto. Verkkodokumentti.  
<<http://wwwedu.oulu.fi/homepage/jpeltone/tilasto/LUKU3/Luku3.htm>>. Luettu 23.9.2012.

Näsman, Paula. 2012. Komplementti, seulonta. Menetelmäohje. Helsinki 17.1.

Seelen, M.A. – Roos, A. – Wieslander, J. – Mollnes, T.E. – Sjöholm, A.G. – Wurzner, R. – Loos, M. – Tedesco, F. – Sim, R.B. – Garred, P. – Alexopoulos, E. – Turner, M.W. – Daha, M.R. 2004. Functional analysis of the classical, alternative and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *Journal of Immunological Methods* 296. 187-198.

Taanila, Aki. 2012. Tilastollinen päättely. Hypoteesin testaus. Verkkodokumentti.  
<<http://myy.haaga-helia.fi/~taaak/p/paattely.pdf>>. Luettu 7.12.2012.

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

Overview of complement system. 2006. Davidson college. Verkkodokumentti.  
<<http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Students/spring2006/Finley/C3.html>>. Luettu 26.3. 2012.

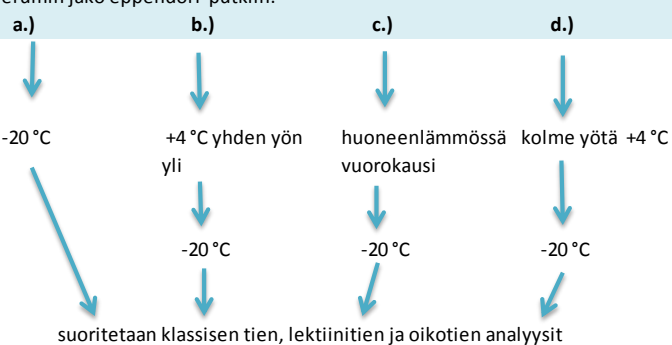
Wieslab Complement system screen. 2010. Document No. E-23-0161-04. CD-ROM. Sweden: Euro Diagnostica AB.

## Koehenkilöltä otettujen seeruminäytteiden säilytykset

### 1. seerumiputki:

näytteiden seisotus huoneenlämmössä 1 h ennen sentrifugointia

seerumin jako eppendorf-putkiin:

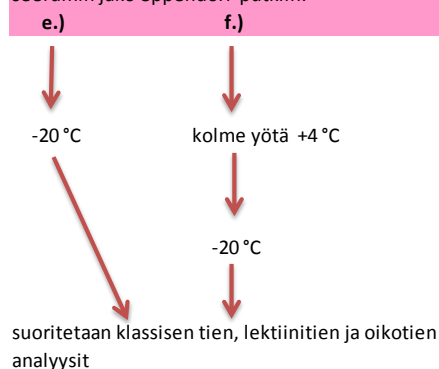


### 2. seerumiputki:

näytteiden seisotus huoneenlämmössä

2 h ennen sentrifugointia

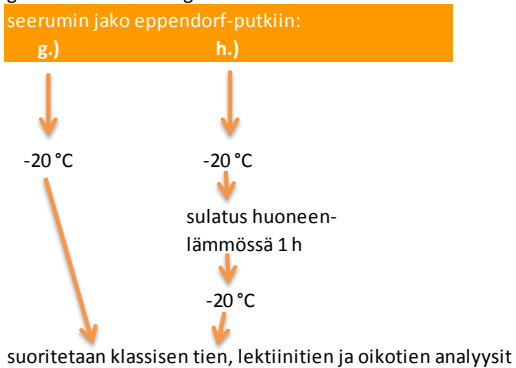
seerumin jako eppendorf-putkiin:



### 3. seerumiputki:

näytteiden seisotus 1 h ennen sentrifugointia sekä sentrifugointi +37 °C

seerumin jako eppendorf-putkiin:



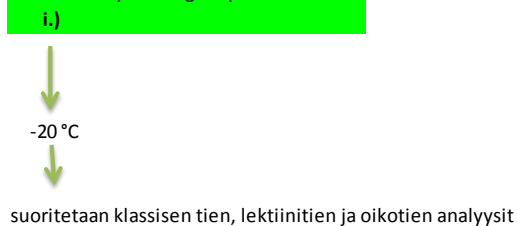
### 4. seerumigeeliputki:

näytteiden seisotus

huoneenlämmössä

1 h ennen sentrifugointia

seerumi säilytetään geeliputkessa.



## Tulokset

Klassisen tien tulokset, aktiivisuus prosenttia (viitearvo 79 %)

näyte n=10	-20 °C		+4 °C yhden yön yli -> -20 °C		huoneenlämmössä vuorokausi -> -20 °C		kolme yötä +4 °C -> -20 °C		-20 °C		kolme yötä +4 °C -> -20 °C		-20 °C		-20 °C -> sulatus huoneenlämmössä 1 h -> -20 °C		-20 °C	
	a1	a2 *	b1	b2 *	c	d	e	f	g	h	i							
1	83	77	25	94	72	98	108	11	81	57	92							
2	78	10	32	50	65	101	103	98	92	65	83							
3	85	86	69	85	33	104	94	97	93	71	91							
4	63	96	68	104	72	95	117	117	112	90	110							
5	83	104	79	108	63	108	100	95	103	130	108							
6	64	79	53	64	0	85	73	70	85	58	82							
7	96	100	72	96	88	119	89	104	106	97	98							
8	101	90	78	1	101	103	90	18	60	85	87							
9	0	0	0	0	98	109	103	106	100	28	106							
10	0	0	43	83	84	95	98	89	102	92	83							

Lektiinitien tulokset, aktiivisuus prosenttia (viitearvo 10 %)

näyte n=9	-20 °C		+4 °C yhden yön yli -> -20 °C		huoneenlämmössä vuorokausi -> -20 °C		kolme yötä +4 °C -> -20 °C		-20 °C		kolme yötä +4 °C -> -20 °C		-20 °C		-20 °C -> sulatus huoneenlämmössä 1 h -> -20 °C		-20 °C	
	a1	a2 *	b1	b2 *	c	d	e	f	g	h	i							
1	142	117	147	127	136	145	151	4	141	146	138							
2	4	0	1	2	9	10	19	12	20	20	13							
3	1	67	23	43	14	47	67	37	92	30	57							
4	122	113	102	136	139	117	136	129	148	91	106							
5	130	139	133	154	152	137	140	115	150	116	114							
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
7	86	99	14	84	96	55	76	85	143	25	79							
8	128	123	149	0	159	107	148	12	114	86	136							
9	0	0	0	0	102	82	92	103	122	6	104							
10	0	0	95	157	135	117	125	132	156	107	127							

Oikotie, aktiivisuus prosenttia (viitearvo 39 %)

näyte	-20 °C	+4 °C yhden yön yli -> -20 °C	huonelämmössä vuorokausi -> -20 °C	kolme yötä +4 °C -> -20 °C	-20 °C	kolme yötä +4 °C -> -20 °C	-20 °C	20 °C -> sulatus huonelämmössä 1 h -> -20 °C	-20 °C		
n=10	a1	a2 *	b1	b2 *	c	d	e	f	g	h	i
1	77	86	83	73	72	70	67	0	82	77	106
2	75	1	18	15	70	66	81	93	88	64	83
3	61	55	68	66	8	54	42	61	61	53	57
4	73	74	79	105	66	71	80	90	94	81	92
5	108	116	98	106	81	92	110	106	116	100	100
6	69	70	70	78	2	65	80	73	74	77	63
7	82	100	85	89	91	87	91	94	85	79	80
8	81	82	92	0	102	61	89	1	7	100	80
9	0	0	0	0	71	116	73	82	71	7	91
10	0	0	76	0	71	82	100	89	90	88	92

1. seerumiputki, sentrifugointi 1h sisällä = a1, a2, b, c, d
2. seerumiputki, sentrifugointi 2h sisällä = e, f
3. seerumiputki, seisotus 1h ja sentrifugointi +37 °C = g, h
4. seerumigeeliputki = i

Tähdellä (\*) merkityt näytesarjat a2 ja b2 ovat uusintoja (uudelleen sulatettuja) näytesarjoista a1 ja b1.