



Laura Mikkonen

# Hemoglobiiniin hapetusasteet ja niiden vaikutus standardiliuosten säilyvyyteen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

10.5.2023

## Tiivistelmä

Tekijä:	Laura Mikkonen
Otsikko:	Hemoglobiinin hapetusasteet ja niiden vaikutus standardiliuosten säilyvyyteen
Sivumäärä:	48 sivua + 6 liitettä
Aika:	10.5.2023
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Prosessikemisti Jenny Manninen Kehityspäällikkö Anne Usvalampi Lehtori Tiina Soinen

---

Opinnäytetyö tehtiin yritykselle Aidian Oy, entinen Orion Diagnostica. Aidian Oy on suomalainen diagnostiikka-alan yritys, joka kehittää ja valmistaa terveydenhuollossa käytettäviä vieritestejä. Opinnäytetyön tavoite oli arvioida hemoglobiinin hapetusasteen vaikutusta standardiliuosten säilyvyyteen ja tutkia eri hapetusasteisten hemoglobiininäytteiden säilyvyyttä eri koeolosuhteissa.

Työn keskiössä olivat hemoglobiinin hapetusasteet: methemoglobiini ja oksihemoglobiini. Näiden kahden eri hapetusmuodon säilyvyyttä tutkittiin neljässä eri olosuhdealtisteessa, jotka olivat huoneenlämpö, jääkaappilämpötila, pimeä olosuhde sekä suoraan valolle altistettu olosuhde. Tutkimushypoteesina oli oksihemoglobiinin auto-oksidaatio eli ilmiö, jossa oksihemoglobiini hapettuisi spontaanisti methemoglobiiniksi.

Testaukset jakautuivat liuossäilyvyyden sekä pakastesäilyvyyden tutkimiseen. Pakastesäilyvyyden näytteet pakastettiin syväjässä  $-70\text{ °C}$ :ssa, minkä jälkeen näytteet sulatettiin ja säilytettiin olosuhdealtisteissa. Liuossäilyvyyttä sekä pakastesäilyvyyttä tutkittiin 20 vuorokauden ajan.

Toisena mittalaitteena käytettiin Nanodrop One C -spektrometriä, jolla mitattiin näytetasojen 100 ja 1000  $\mu\text{g/ml}$  absorbanssia sekä näytteiden koko spektriä. Toisena mittalaitteena käytettiin QuikRead go -diagnostiikkalaitetta, jolla mitattiin näytetasojen 0,1 ja 1  $\mu\text{g/ml}$  absorbanssimuutoksia.

Kaikille absorbanssituloksille suoritettiin kaksisuuntainen t-testi olettaen varianssit yhtä suuriksi. Tällä pyrittiin selvittämään absorbanssimuutoksen merkittävyys luottamustasolla 95 %. Luottamustasolla 95 % parhaan tuloksen antoi pakastettu näytetaso 1  $\mu\text{g/ml}$ , joka säilyi methemoglobiinista valmistettuna 144 tuntia ja oksihemoglobiinista puolestaan 192 tuntia siten, että pakastettu näyte säilytettiin sulatuksen jälkeen jääkaappikylmässä ja valolta suojattuna.

Avainsanat: hemoglobiini, hapetusasteet, säilyvyys

## Abstract

Author: Laura Mikkonen  
Title: Hemoglobin's oxidation stages and their effect on the hemoglobin solution's stability  
Number of Pages: 48 pages + 6 appendices  
Date: 10<sup>th</sup> of May 2023

Degree: Bachelor of Laboratory Sciences  
Degree Programme: Degree programme  
Professional Major: Laboratory Sciences  
Supervisors: Jenny Manninen , Process Chemist at Aidian  
Anne Usvalampi, Development Manager at Aidian  
Tiina Soininen, Senior Lecturer at Metropolia

---

This thesis was carried out for Aidian Oy, formerly known as Orion Diagnostica. Aidian Oy is a Finnish company that specializes in developing and manufacturing diagnostic point of care tests for healthcare. The aim of the thesis was to study the different oxidation stages of hemoglobin, determine the effect of the oxidation stages of hemoglobin on the solution's stability and to research the effects of different circumstance exposures to the solution's stability.

At the centre of the thesis were two oxidation stages of hemoglobin; methemoglobin and oxyhemoglobin. The effect of these two oxidation stages was studied in four circumstance exposures; room temperature, refrigerator temperature, protected from light and direct exposure to light.

The measurements were done in two parts: first one concentrating on the liquid stability of hemoglobin in different exposures and the second part where the hemoglobin samples were frozen in -70 °C, defrosted and then stored in the different circumstance exposures. These stability measurements lasted for 20 days. One of the used measurement apparatus was Nanodrop One C spectrometer which was used to measure the absorbance of the samples containing 100 and 1000 µg/ml of hemoglobin. The spectrometer was also utilised in the study of finding and following the transition of hemoglobin's oxidation stages' maximal absorbance peak. The second apparatus was QuikRead go diagnostic device. With QuikRead go the samples 0,1 and 1 µg/ml were measured to monitor the change of the absorbance.

A two sided t-test was performed to all of the results, assuming variances equal. Confidence level of 95 % was chosen. On this confidence level the best stability result was received from a frozen and defrosted 1 µg/ml sample. This sample was stored in refrigerator temperature protected from light. Methemoglobin sample stayed stable for 144 hours and oxyhemoglobin sample's stability time was determined to be 192 hours in these conditions.

Keywords: hemoglobin, oxidation stages, stability

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Hemoglobiini	1
2.1	Hemoglobiini IVD-potilasdiagnostiikassa	2
2.2	Ulosteperäinen hemoglobiini	2
2.3	Hemoglobiinin rakenne	3
2.4	Hemoglobiinin sitoutuminen ja hapetusmuodot	5
2.5	Hemoglobiinin stabiilius ja säilyvyys	8
2.5.1	Lämpötilan vaikutus	8
2.5.2	pH:n vaikutus	9
2.5.3	Valon vaikutus	9
3	Hemoglobiinin analyysimenetelmät	10
3.1	Absorbanssin mittaaminen spektrofotometrisesti	11
3.1.1	Tutkimusraportti 1	11
3.1.2	Tutkimusraportti 2	12
3.1.3	Tutkimusraportti 3	14
3.2	Immunoturbidimetrisen analyysin spektrofotometrisesti	15
4	Tutkimusmenetelmät, näytteet ja testaus	16
4.1	Laitteet ja menetelmät	16
4.1.1	Nanodrop One C	17
4.1.2	QuikRead go	17
4.2	Näytteet	18
4.2.1	Liuossäilyvyysnäytteet	19
4.2.2	Pakastennäytteiden säilyvyys	22
4.3	Testaus	23
5	Liuossäilyvyystutkimustulokset	24
5.1	Nanodrop-tulokset	24
5.1.1	Nanodrop-absorbanssit ja t-testit	25
5.1.2	Nanodrop-spektrit	27
5.2	QuikRead go-tulokset ja t-testit	27

5.2.1	QuikRead go hemoglobiinimuutos	29
6	Pakastesäilyvyytutkimustulokset	33
6.1	Nanodrop-tulokset	33
6.1.1	Nanodrop-absorbanssit ja t-testit	33
6.1.2	Nanodrop-spekrit	35
6.2	QuikRead-go	36
6.2.1	QuikRead go -hemoglobiinimuutos	38
7	Johtopäätelmät ja kehityskohdat	42
7.1	Johtopäätelmät	42
7.2	Kehityskohdat	43
7.2.1	Lähtömateriaalit	43
7.2.2	Temperointikäytänteet	44
	Lähteet	45

#### Liitteet

Liite 1: Liuossäilyvyyšnäytteiden Nanodrop-absorbanssien t-testitulokset

Liite 2: Liuossäilyvyyšnäytteiden Nanodrop-spektrien maksimiabsorbanssit

Liite 3: Liuossäilyvyyšnäytteiden QuikRead go-absorbanssimuutosten t-testitulokset

Liite 4: Pakastesäilyvyyšnäytteiden Nanodrop-absorbanssien t-testitulokset

Liite 5: Pakastesäilyvyyšnäytteiden Nanodrop-spektrien maksimiabsorbanssit

Liite 6: Pakastesäilyvyyšnäytteiden QuikRead go-absorbanssimuutosten t-testitulokset

## Lyhenteet

CRP	<i>C-reactive protein</i> . C-reaktiivinen proteiini on indikaattori, jonka pitoisuuden avulla voidaan päätellä, onko tulehdusreaktion aiheuttaja bakteeri vai virus.
iFOBT	<i>Immunochemical Fecal Occult Blood Test</i> . QuikRead go-laitteelle saatavilla oleva tuote, jolla analysoidaan hemoglobiinia ulostematriisista.
IVD	<i>In vitro -diagnostiikka</i> . Ei-invasiivinen eli kajoamaton testaustapa, joka tehdään elimistön ulkopuolella potilaan verestä tai muista kehon nesteistä tai kudoksista.
POC	<i>Point-of-care</i> . Vieritesti eli laboratoriotesti, joka suoritetaan potilaan lähellä. Vieritestauksen tuloksen perusteella voidaan muodostaa potilaan hoitopäätös.
RT	<i>Room temperature</i> . Huoneenlämpö. Lyhenteellä viitataan liuosten tai reagenssien säilytyslämpötilaan.
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible Light Spectroscopy</i> . Spektrofotometri, jolla mitaukset suoritetaan ultraviolettivalon ja näkyvän valon aallonpituuksilla.

## 1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin yritykselle Aidian Oy, joka on aikaisemmin tunnettu nimellä Orion Diagnostica. Aidian Oy on suomalainen diagnostiikka-alan yritys, joka kehittää ja valmistaa terveydenhuollossa käytettäviä vieritestejä.

Standardilaimennosten säilyvyyden tutkiminen mahdollistaa Aidian Oy:n tuoteprosessin jatkuvan parantamisen ja kehittämisen kohti vakioitua toimintamallia, jossa tuotteen testaukseen käytettävä standardilaimennossarja olisi mahdollista ottaa käyttöön suoraan pakastesäilytyksestä. Nykyisen käytänteen mukaan standardilaimennossarja valmistetaan päivittäin testaustarpeen mukaisesti tietyn hapetusasteen omaavasta hemoglobiinista ja se säilyy huoneenlämpötilassa vain vuorokauden ajan. Tutkittu tieto standardilaimennoksien pidempiaikaisesta säilyvyydestä johtaisi parhaimmillaan työprosessin parantamiseen siten, että osaston prosessiteknikkolaboranttien työn kuormittavuus ja testaustyöhön käytetty työaika pienenesi merkittävästi.

Tämän opinnäytetyön kokeellisessa laboratorio-osuudessa on tarkoitus selvittää, miten eri olosuhteet vaikuttavat valmistettujen standardilaimennosten säilyvyyteen. Koeasetelmassa tutkitaan hemoglobiinin hapetusasteen, lämpötilan ja valon vaikutusta säilyvyyteen. Tutkimus toteutetaan siten, että osa näytteistä valmistetaan oksihemoglobiinista ja osa methemoglobiinista.

## 2 Hemoglobiini

Hemoglobiini on punasoluissa esiintyvä metalloproteiini, jonka tärkein tehtävä on sitoa happimolekyylejä ja kuljettaa niitä verenkierron mukana keuhkoista kudoksiin ja elimiin. Hemoglobiini kuljettaa myös kudoksissa soluhengityksessä muodostuneen hiilidioksidin takaisin keuhkoihin uloshengitettäväksi. [1.]

Hemoglobiini muodostaa jopa 96 % punasolun kuivapainosta [2].

## 2.1 Hemoglobiini IVD-potilasdiagnostiikassa

Hemoglobiinilla on IVD-potilasdiagnostiikassa merkittävä rooli potilaan hoitopäätöksien muodostamisessa. Hemoglobiini on yksi perusverenkuvaan kuuluvista osatutkimuksista, jonka analysoinnilla saadaan kattavasti tärkeää tietoa potilaan voinnista hoitopäätöstä varten.

Duodecim-tietokannassa hemoglobiinille on määritelty normaaliarvot miehille (134–167 g/l), naisille (117–155 g/l) sekä eri-ikäisille lapsille. Viitearvot on esitetty taulukossa 1. Viitearvot perustuvat Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorion HUSLABin käyttämiin viitearvoihin. [3;4.]

Taulukko 1. Hemoglobiinin normaaliarvot [3;4.]

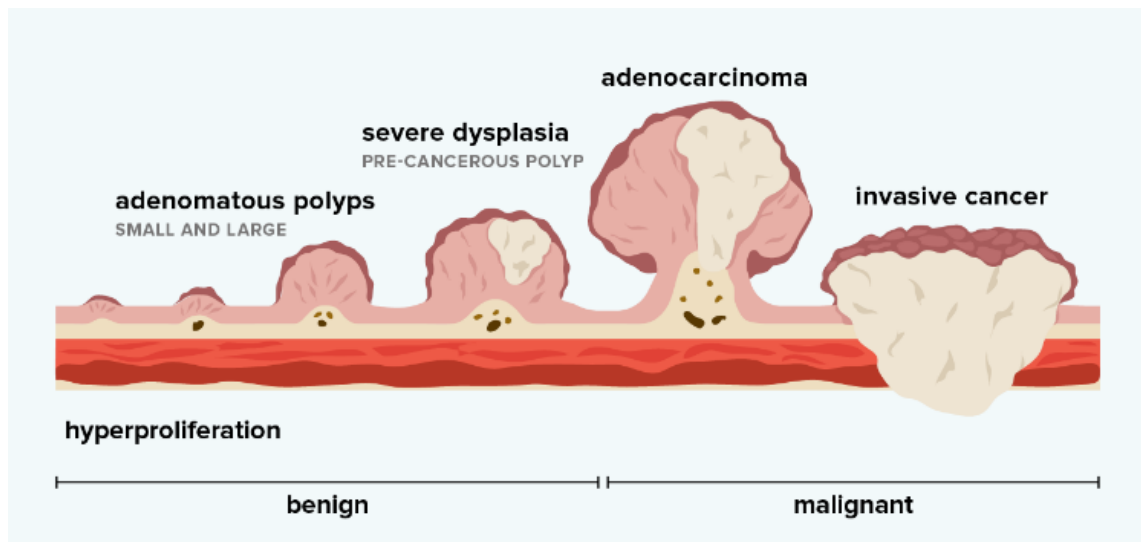
Potilasryhmä	Normaali hemoglobiini (g/l)
Miehet	134–167
Naiset	117–155
Lapset, vastasyntyneet	170–200
Lapset, 2–3kk	110–120
Lapset, kouluikäiset	130–140

## 2.2 Ulosteperäinen hemoglobiini

Potilasdiagnostiikassa hemoglobiinia voidaan mitata veren lisäksi myös muista matriiseista. Tässä opinnäytetyössä keskiössä on diagnostinen testi, jolla voidaan mitata kvantitatiivisesti ulosteessa olevaa verta. Ulosteperäisen hemoglobiinin detektoiminen voi todentaa diagnoosin, kun potilaalla epäillään alemman mahasuolikanavan verenvuotoa. Lähtökohtaisesti terveellä ihmisellä ulosteesta ei pitäisi löytyä hemoglobiinia lainkaan.

Alemman mahasuolikanavan verenvuodolla voi olla useita syitä. Ulosteen piilevä veri voi kertoa paksusuolen syövästä tai muusta ruoansulatuskanavan häiriöstä. Paksusuolen ja peräsuolen alueella esiintyvä syöpä voi lähteä kehittymään muiden syöpätyyppien tavoin hyvänlaatuisesta soluliikakasvustosta. Liikakasvusto voi ilmetä suolen limakalvon pullistumisena. [5.]

Limakalvon pullistuman aiheuttavat polyypit sekä adenoomat. Polyypin ja myöhemmän vaiheen adenoomien ja mahdollisten syöpäsolukasvainten verisuonet ovat helposti rikkoutuvia, mikä johtaa siihen, että verta pääsee suolistoon ja täten ulosteeseen. [5.] Alla kuvassa 1 on esitetty polyypin kehittyminen adenoomaksi ja lopulta pahanlaatuisiksi kasvaimeksi asti.



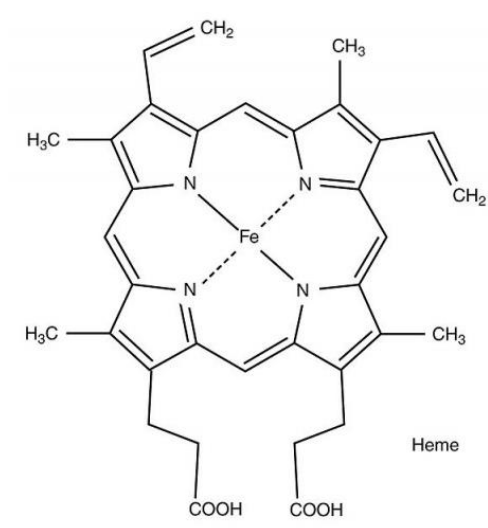
Kuva 1. Polyypin kehittyminen solun liikakasvusta adenooman kautta invasiiviseksi suolistosyöväksi. [6.]

### 2.3 Hemoglobiinin rakenne

Hemoglobiini on metalloproteiineihin kuuluva molekyyli. Metalloproteiinilla tarkoitetaan proteiinia, johon on sitoutunut vähintään yksi metalli-ioni. [7.] Hemoglobiinin metalli-ioni on rauta  $Fe^{2+}$ , joka mahdollistaa laajan kirjon erilaisia kemiallisia reaktioita, kuten hapetus- ja pelkistymisreaktiot. [2;7.] Aktiivinen hemoglobiini koostuu neljästä monomeeriyksiköstä. Jokainen monomeeri

muodostaa sisällensä hydrofobisen taskun, johon on liittynyt yksi molekyylin pinnalla sijaitseva hemiryhmä.

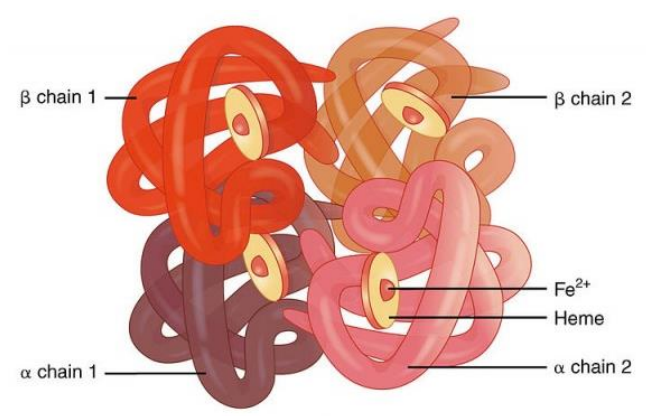
Yhdessä monomeerit muodostavat heterotetrameerirakenteen. Varautunut rauta-atomi on hemoglobiinin jokaisen monomeerin keskellä osana hemirakennetta. Hemi koostuu porfyriinirenkaasta, jossa rauta-atomi on sitoutunut kovalenttisesti neljään typpiin. Yksi hemiryhmä kykenee sitomaan yhden happimolekyylin [2], eli yksi hemoglobiinimolekyyli pystyy sitomaan yhteensä neljä happimolekyyliä. Hemiryhmän kemiallinen rakennekaava on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Hemiryhmän kemiallinen rakennekaava [2.]

Hemoglobiinilla on useita erilaisia rakennemuotoja. Yleisin aikuisen hemoglobiinin muoto on hemoglobiini A1 (Hb-A1) ja se muodostaa noin 96–98 % aikuisen hemoglobiinin kokonaismäärästä. [8.] Se koostuu neljästä alayksiköstä, kahdesta  $\alpha$ - ja kahdesta  $\beta$ - polypeptidiketjusta. [2.]

Hemoglobiini on muodoltaan pallomainen ja sen halkaisija noin 5,5 nm [9.] Molekyylibiologi Max Perutz tutki hemoglobiinia yli 25 vuoden ajan ja onnistui selvittämään hemoglobiinin kolmiulotteisen rakenteen vuonna 1959. [10.] Hb-A1:n kolmiulotteista rakennetta on havainnollistettu kuvassa 3.

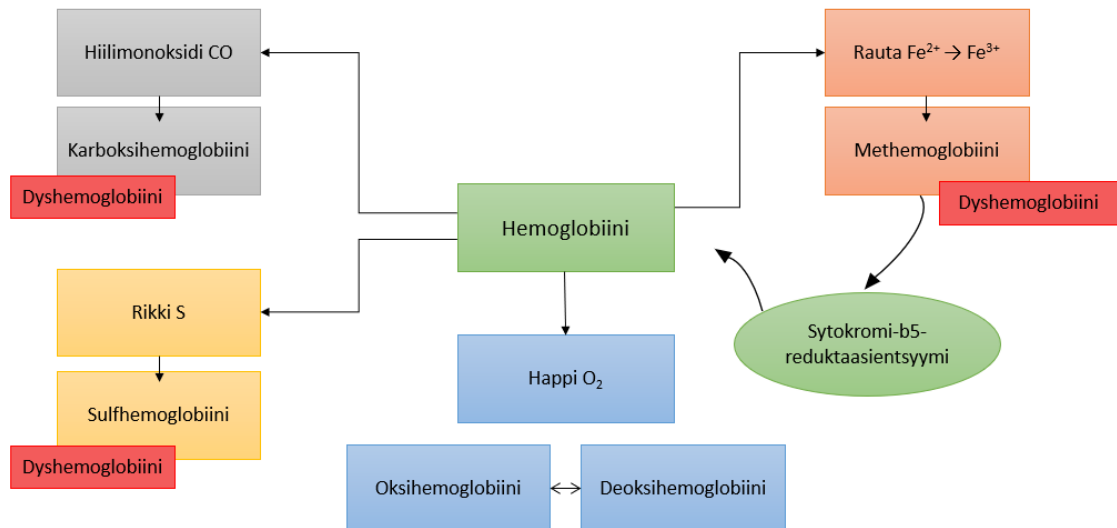


Kuva 3. Hemoglobiinin Hb-A1:n kolmiulotteinen rakenne [2.]

Hemoglobiinin muita muotoja ovat hemoglobiini A2 sekä hemoglobiini F. Hemoglobiini A2 koostuu kahdesta  $\alpha$ - ja kahdesta  $\delta$ -ketjusta. Aikuisen veren kokonaishemoglobiinin määrästä hemoglobiini A2 muodostaa vain pienen osan, noin 2,5 %. Hemoglobiini F koostuu kahdesta  $\alpha$ - ja kahdesta  $\gamma$ -ketjusta. Hemoglobiini F on sikiöajan hemoglobiinin muoto ja vaihtuu syntymän jälkeen yleisimpään hemoglobiinimuotoon Hb-A1 noin 3–6 kuukauden kuluttua syntymästä. Tämä hemoglobiinin muoto F ei kuitenkaan katoa kokonaan, vaan muodostaa myöhemmällä iällä noin 0,5–0,8 % aikuisen kokonaishemoglobiinin määrästä. [8, s. 88]

#### 2.4 Hemoglobiinin sitoutuminen ja hapetusmuodot

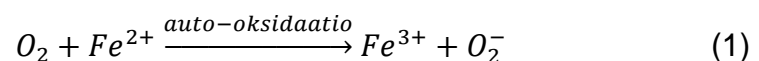
Hemoglobiini on vuorovaikutuksessa eri molekyylien kanssa. Hemoglobiiniin voi sitoutua happi, hiilimonoksidi, rikki sekä rauta. Alla kuvassa 4 on koottu ja havainnollistettu luvun käsitteistöä.



Kuva 4. Hemoglobiinin sitoutuminen eri molekyyleihin

Hapen kuljettaminen keuhkoista kudoksiin on hemoglobiinin tärkein tehtävä. Oksihemoglobiini on hemoglobiinia, johon on sitoutunut happi. Kun hemoglobiini ei ole sitoutunut happeen, eli toisin sanoen hemoglobiini on luovuttanut happimolekyylin, viitataan hemoglobiiniin käsitteellä deoksihemoglobiini. [2.] Oksihemoglobiinin ja deoksihemoglobiinin välillä tapahtuu reversiibeli reaktio, normaali hapen sitominen ja luovuttaminen.

Oksihemoglobiini on kohtalaisen stabiili molekyyli, mutta hapettuu ajan myötä methemoglobiiniksi. Tätä ilmiötä kutsutaan auto-oksidaatioksi. Methemoglobiini on auto-oksidaation lopputuote, jossa hapen elektroni on siirtynyt kokonaan raudasta hapelle. Hapen sitoutuessa rautaan rauta hapettuu ja se muuttuu kahdenarvoisesta  $Fe^{2+}$  *ferro* muodosta kolmenarvoiseen  $Fe^{3+}$  *ferri* muotoon. Samalla muodostuu superoksidi  $O_2^-$ . Oksihemoglobiinin määrästä noin 3 % hapettuu spontaanisti auto-oksidaation kautta methemoglobiiniksi. [11,12.] Alla kaavassa 1 on kuvattu methemoglobiinin muodostuminen.

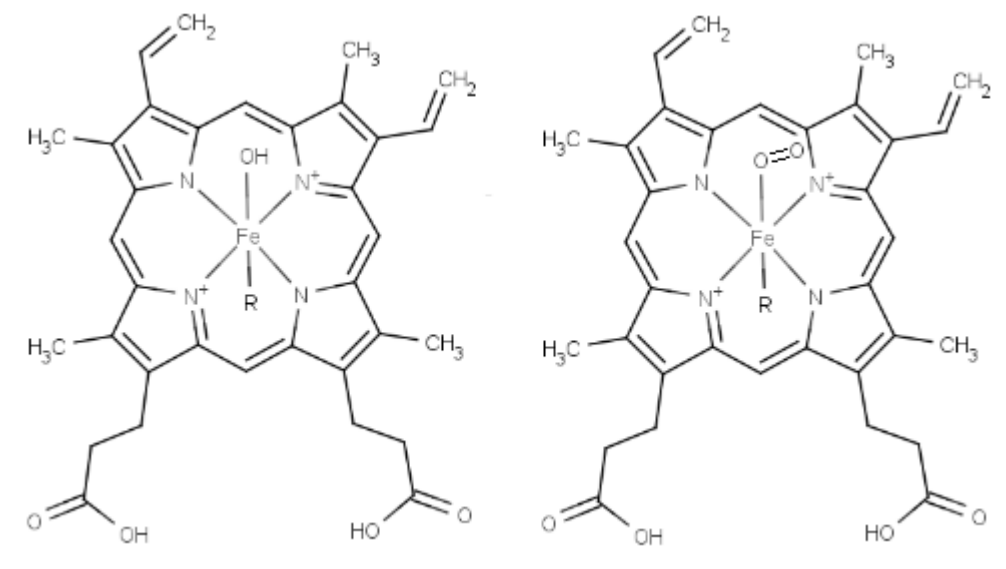


Hemoglobiini, jonka rauta-atomi on hapettunut kolmenarvoiseksi, ei voi sitoutua enää happimolekyyliin uudelleen. Hapteen sitoutumiskyvyttömyyttä hemoglobiinia kutsutaan dyshemoglobiiniksi.[13.]

Punasolut sisältävät sytokromi-b5-reduktaasientsyymiä, joka pelkistää methemoglobiinin takaisin alkuperäiseen kahdenarvoiseen muotoonsa. Ilman sytokromi-b5-reduktaasientsyymien katalysoivaa vaikutusta methemoglobiiniin kaikki hemoglobiini hapettuisi ajan myötä methemoglobiiniksi. [11,14.]

Sytokromi-b5-reduktaasientsyymi siis mahdollistaa hemoglobiinin normaalin toiminnan korjaamalla virhereaktiossa syntyvää methemoglobiinia.

Oksihemoglobiinin ja methemoglobiinin hemien rakennekaavat on esitetty alla kuvassa 5.



Kuva 5. Methemoglobiinin (vas.) ja oksihemoglobiinin (oik.) hemiryhmän rakennekaavat [15.] Methemoglobiiniin raudan yläpuolelle on kiinnittynyt alkoholiryhmä ja vastavasti oksihemoglobiinin rautaan on kiinnittynyt happiatomi, josta lähtee kaksoissidos toiseen happiatomiin.

Hemoglobiini voi reagoida myös hiilimonoksidin, CO, kanssa. Hiilimonoksidi, kansankielisesti häkä, omaa korkeamman affiniteetin hemoglobiiniin kuin happi. Ilmiö johtuu hiilimonoksidin elektronikonformaatiosta, jossa hiilimonoksidi on kohtisuorassa hemin tasorakenteeseen nähden. [16.] Hiilimonoksidi sitoutuu hemoglobiinin hydrofobiseen taskuun ja hiilimonoksidi toimii täten kilpailevana

inhibiittorina happimolekyylille. Kun hiilimonoksidi korvaa hapelle tarkoitetun tilan hemoglobiinissa, kudokset eivät saa tarvitsemaansa happea.

Hiilimonoksidi ei irtaudu hemoglobiinista korkean affiniteetin takia. Tila johtaa lopulta häikämyrkytykseen, jossa äärimmäinen hapenpuute voi johtaa kuolemaan. Hemoglobiinista, johon hiilimonoksidi on sitoutunut, käytetään termiä karboksyhemoglobiini. [17.] Tällainen hemoglobiini ei pysty enää sitoutumaan happeen, joten myös karboksyhemoglobiini on dyshemoglobiini.

Hemoglobiini voi reagoida myös rikin kanssa. Rikin kanssa reagoidessaan hemoglobiini ja rikki muodostavat sulfhemoglobiinin. Sulfhemoglobiini muodostuu, kun hemoglobiinin hemiin liittyy rikkiatomi. Rikkiatomi estää hapen sitoutumisen hemoglobiiniin. Sulfhemoglobiini on siis myös dyshemoglobiini. Sulfhemoglobiinin runsas määrä veressä aiheuttaa samankaltaisia hypoksian eli hapenpuutteen oireita kuin hiilimonoksidille altistuminen. Oireisiin kuuluu myös syanoosi, joka on iholla tai limakalvoilla esiintyvä sinipunertava epänormaali väri-ilmiö. [18,19]

## 2.5 Hemoglobiinin stabiilius ja säilyvyys

Kuten edellä on kuvattu, hemoglobiini on reaktiivinen biomolekyyli, mutta samalla se on altis ympäristöolosuhteiden muutoksille. Muiden proteiinien tavoin hemoglobiinilla on tietyt optimiolosuhteet.

### 2.5.1 Lämpötilan vaikutus

Lämpötilan vaikutusta hemoglobiiniin sekundäärirakenteisiin, eli  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketjuihin, oli tutkittu UV-Vis spektrometrian avulla keräten tietoa näytteen säilyvyydestä. Greenwichin yliopiston tutkimuksessa [20.] tarkasteltiin kahta säilytyslämpötilaa:  $23 \pm 2$  °C ja  $4 \pm 1$  °C. Säilyvyyttä seurattiin 40 päivän ajan pH-arvoissa 6, 7 ja 8. Näytteiden annettiin temperoitua 10 minuuttia ennen mittauksen suorittamista. Spektrit mitattiin aallonpituuksilla 200-700nm. Tutkimuksessa havaittiin, että jääkaappilämpötilassa  $4 \pm 1$  °C näytteet säilyivät stabiileina. Hemoglobiinin rakenteellisia muutoksia huomattiin jo yhden päivän

kuluttua näytteissä, joita oli säilytetty huonelämpötilassa. Hemoglobiinin rakenteellisten muutosten havaittiin korreloivan voimakkaasti liuoksen pH-arvon kanssa. Huoneenlämmössä säilytetty hemoglobiini, jonka liuoksen pH oli säädetty arvoihin 6–7, oli rakenteellisesti hitaampi muuttumaan verrattuna huoneenlämmössä säilytettyyn hemoglobiiniin, jonka pH oli 8. [20.]

### 2.5.2 pH:n vaikutus

Jinan yliopiston tutkimuksessa [21] kartoitettiin pH:n vaikutusta hemoglobiinin kolmiulotteisen rakenteen kokoon. Fysiologisissa olosuhteissa pH:n ollessa 7,1–7,4 hemoglobiinin kolmiulotteinen tetrameerimuoto oli leveimmillään keskimäärin 5,3–5,6 nm. pH-olosuhteiden ollessa happamat (pH 5,4; 5,9 ja 6,2) sekä emäksiset (pH 9) hemoglobiini muuttui monomeeriseen muotoon ja halkaisija pieneni noin 3,4–3,7 nm:iin. pH:n ollessa vielä lähellä fysiologisia olosuhteita (pH 8) hemoglobiinin halkaisijaksi määriteltiin 4,6 nm. [21.]

### 2.5.3 Valon vaikutus

Valon vaikutusta biomolekyylien rakenteisiin tutkittiin Saksan Ruhr-Universität Bochum -yliopistossa, jossa tutkimus kohdistui viherhiukkasissa esiintyvään väriaineproteiiniin fytokromiin. Fytokromin havaittiin olevan valolle altis siten, että sen avaruudellinen rakenne muuttui riippuen valo-olosuhteista. [22.] On olemassa useita biomolekyyliä, joita ei vielä ole tutkittu valoaltisteen kannalta. Hemoglobiini on yksi näistä biomolekyyleistä.

Hemoglobiinin rauta värjää punasolut tyypillisen punaisiksi. Hemoglobiinin eri hapetusmuodoilla on havaittu olevan vaikutus siihen, minkä värisenä punasolu havaitaan. Deoksihemoglobiinia omaava punasolu näyttäytyy sinipunertavana, kun taas hapen sitonut oksihemoglobiini vaikuttaa punasoluun siten, että punasolu näyttäytyy väriltään kirkaanpunaisena. [23.] Voi siis olla, että valolla on vaikutusta värillisen proteiinin rakenteeseen kuten yllä kuvatun fytokromin tapauksessa, mutta julkaistua tutkimustietoa valonvaikutuksesta hemoglobiinin

rakenteisiin ei löydy.

### 3 Hemoglobiinin analyysimenetelmät

Potilasdiagnostiikassa matriisit ovat ihmiseritteitä. Veren ja ulosteen lisäksi hemoglobiinia voidaan mitata virtsasta sekä syljestä. [24,s. 63-69; 25.] Analyysimenetelmän valintaan vaikuttaa merkittävästi näytematriisi, josta hemoglobiini analysoidaan.

Potilasdiagnostiikassa käytettävät laboratoriotestit voidaan jakaa toimintamalleiltaan karkeasti analysaattoritestaukseen ja POC-testeihin (point-of-care-testing) eli vieritestaukseen.

Analysaattoritestauksella tarkoitetaan perinteisempää testausmallia, jossa terveyskeskuksen tai sairaalan näytteenottaja suorittaa näytteenoton potilaalta ja toimittaa analysoitavan näytteen kliiniseen laboratorioon tutkittavaksi. Laboratoriohenkilökunta suorittaa diagnostisen testin kliinisessä laboratoriossa. Diagnostisen testin suorittamiseen kuuluu testauksen tyypistä riippuen muutamia päiviä, jonka jälkeen testitulokset raportoidaan terveydenhuollon toimipisteelle. Terveydenhuollon henkilökunta saattaa testaustuloksen potilaan tietoon ja testituloksen perusteella tehdään potilaan hoitopäätös. Kokonaisuudessaan hoitopäätöksen syntymiseen saattaa kulua useita päiviä tai viikko. [26.]

Vieritestauksella puolestaan tarkoitetaan potilaan lähellä tai vieressä suoritettavaa testausta, jonka tuloksella on välitön vaikutus potilaan hoitoon ja hoitopäätöksiin. Vieritestausta voidaan suorittaa kliinisen laboratorion ulkopuolella kuten terveydenhuollon toimipisteissä sekä sairaalaosastoilla, joissa työskentelevät potilaan hoidosta vastaavat ammattilaiset kuten sairaanhoitajat ja terveydenhoitajat, joilta ei vaadita laboratoriohenkilökunnan pätevyyttä. [27;28.] Vieritestauksen etuna on prosessiketjun merkittävä lyhentäminen ja nopeampi hoitopäätöksen syntyminen. Potilaan kannalta kriittinen parametri on hoitopäätöksen nopea muodostuminen.

### 3.1 Absorbanssin mittausspektrofotometrisesti

Nanodrop-laitteen mittaussuomen luomiseksi tarkasteltiin useita hemoglobiinin hapetusmuodoille aikaisemmin suoritettuja säilyvyystutkimuksia.

Säilyvyystutkimusten tarkastelun avulla oli tarkoitus selvittää, miten hemoglobiinin eri hapetusmuotoja voitaisi mitata spektrofotometrisesti.

#### 3.1.1 Tutkimusraportti 1

Ensimmäisessä tarkasteltavassa tutkimusraportissa mitattiin hemoglobiinin eri hapetusmuotoja spektrofotometrisesti hyödyntäen isosbestistä pistettä.

Verinäytteet esikäsiteltiin siten, että mitattavissa näytteissä oli kerrallaan vain kahta hemoglobiinin muotoa, tutkittavaa hemoglobiinin hapetusmuotoa sekä syanomethemoglobiinia referenssinäytteenä. [29, s. 200–201] Tutkimuksen hemoglobiinimuotojen spektrit on esitetty alla kuvassa 6.

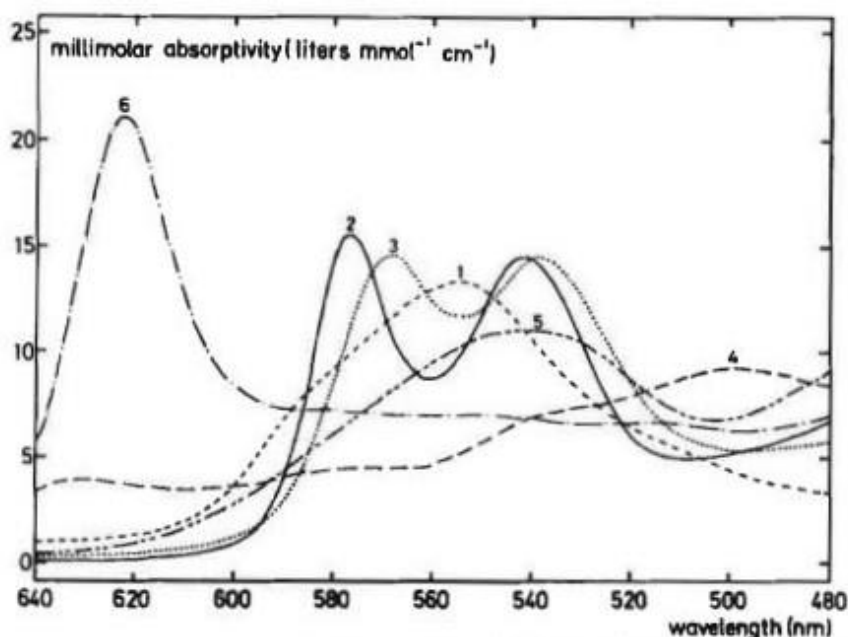


FIG. 10. Absorption spectra of (1) Hb, (2) HbO<sub>2</sub>, (3) HbCO, (4) Hi, (5) HiCN, and (6) SHb.

Kuva 6 Hemoglobiinin absorptiospektrit (1) deoksihemoglobiini, (2) oksihemoglobiini, (3) karboksihemoglobiini, (4) methemoglobiini, (5) syanomethemoglobiini ja (6) sulfhemoglobiini. [29, s. 200-201]

Kuten kuvasta 6 on havaittavissa, useat spektrit esiintyvät päällekkäisinä. Eri hemoglobiinimuotojen todellisten pitoisuuksien analysoimiseksi tässä tutkimuksessa määriteltiin isobestisen pisteen avulla aallonpituudet, joiden avulla pystyttiin laskemaan hemoglobiinimuotojen suhde toisiinsa. [29, s.200-201] Taulukkoon 2 on koottu tutkimusartikkelin methemoglobiinin tutkittuja aallonpituuksia.

Taulukko 2. Methemoglobiinin aallonpituudet pH alueella 7,0-7,4 ja millimolaariset absorptiviteetit [29.]

$\lambda$	$\epsilon^\lambda$	Notaatio
690	0,13	Minimi
630	3,70	Maksimi
608	3,06	Minimi
600	3,20	Isobestinen deoksihemoglobiinin kanssa
590,5	3,62	Isobestinen oksihemoglobiinin kanssa
585,5	3,79	Isobestinen karboksihemoglobiinin kanssa
528,5	7,71	Isobestinen deoksihemoglobiinin kanssa
525,5	7,72	Isobestinen oksihemoglobiinin kanssa
519,5	8,02	Isobestinen karboksihemoglobiinin kanssa
500	9,04	Maksimi
476	8,04	Minimi
406	162	Maksimi

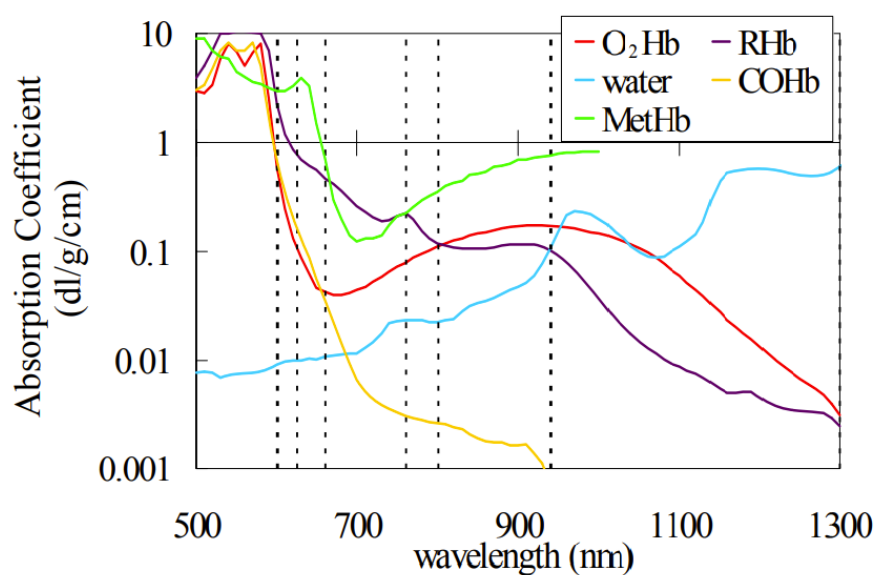
### 3.1.2 Tutkimusraportti 2

Wasedan yliopistossa kehitettiin noninvasiivinen metodi totaalihemoglobiinin, karboksihemoglobiinin sekä methemoglobiinin mittaamiseksi. Eri hemoglobiinimuodoille käytetyt aallonpituudet on ilmaistu taulukossa 3.

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytetyt aallonpituudet ja tutkitut hemoglobiinimuodot. [30.]

Hemoglobiinimuoto	$\lambda$ (nm)
Oksihemoglobiini	800, 660
Methemoglobiini	625
Karboksihemoglobiini	600

Tutkimuksessa methemoglobiinia mitattiin 625 nm:n aallonpituudella ja oksihemoglobiinia puolestaan 660 sekä 800 nm. [30.] Alla kuvassa 8 on esitetty tutkimuksessa saatuja hemoglobiinivarianttien spektrejä.



Kuva 7. Hemoglobiinivarianttien spektrejä. O<sub>2</sub>Hb viittaa oksihemoglobiiniin ja MetHb methemoglobiiniin. RHb viittaa pelkistyneeseen hemoglobiiniin eli deoksihemoglobiiniin ja COHb karboksihemoglobiiniin. Katkoviiva osoittaa tutkimuksessa käytetyn mittausaallonpituuden. [30.]

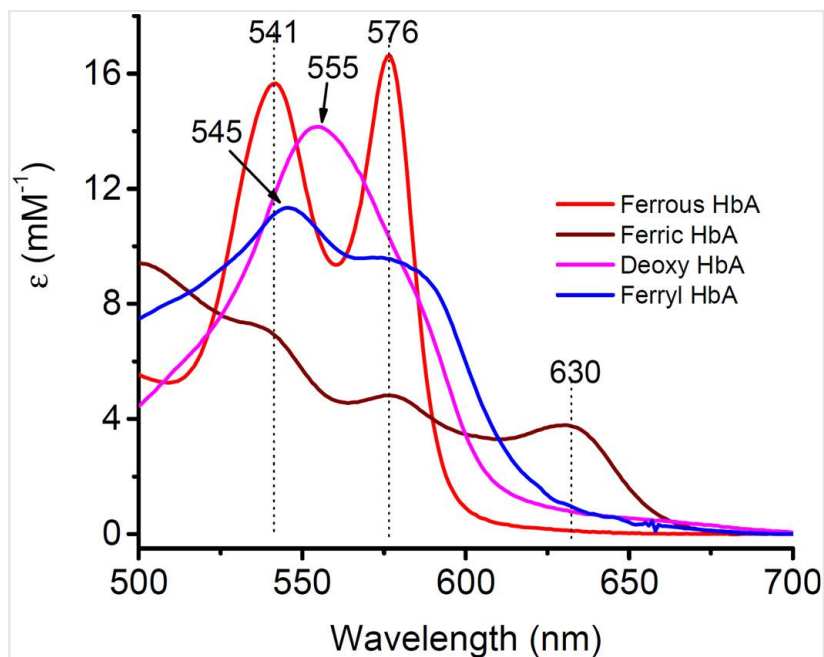
### 3.1.3 Tutkimusraportti 3

Marylandin biologian tutkimus- ja evaluaatiokeskuksen tutkimuksessa hemoglobiinin eri hapetusmuodoille määriteltiin uudet ekstinktiokertoimet [31]. Hemoglobiinivarianttien kokonaisten spektrien tutkimuksissa havaittiin, että eri hemoglobiinimuodot muodostavat hapetusasteelle tyypillisiä piikkejä eri aallonpituuksilla. Alle taulukkoon 4 on koottu kokonaisista spektreistä havaittuja piikkejä hemoglobiinin eri hapetusmuodoille.

Taulukko 4. Kokonaisista spektreistä havaitut piikit eri hemoglobiinivarianteille [31.]

<b>Variantti</b>	<b>Piikit, nm</b>
Oksihemoglobiini	541, 576
Deoksihemoglobiini	555
Methemoglobiini	541, 576, 630

Alle kuvaan 8 on koottu puolestaan tässä tutkimuksessa havaitut hemoglobiinispektrit.



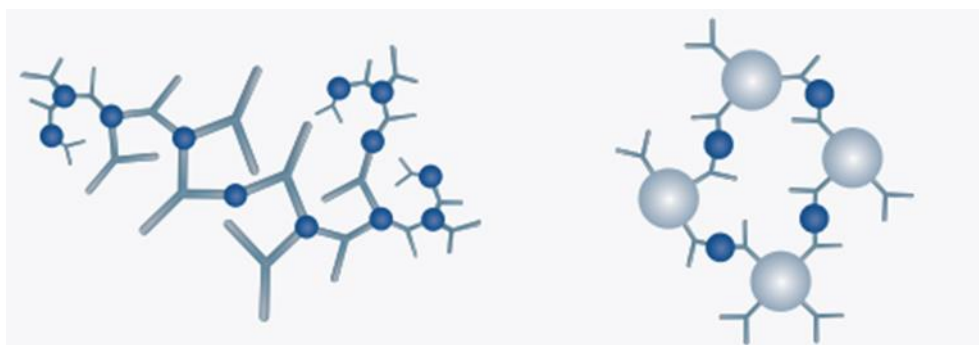
Kuva 8 Hemoglobiinispektrit. Punainen kuvaaja indikoi oksihemoglobiinia, rusehtava viiva methemoglobiinia, pinkki deoksihemoglobiinia ja sininen puolestaan harvinaista 4-asteiseksi hapettunutta hemoglobiiniamuotoa. [31.]

### 3.2 Immunoturbidimetrinen analyysi spektrofotometrisesti

Immunoturbidimetrian avulla voidaan määrittää näytteen kohdeantigeeniproteiinit kvantitatiivisesti. Menetelmä perustuu spesifisesti määriteltyyn antigeeni-vasta-ainereaktioon, jonka seurauksena tapahtuu agglutinaatio. Agglutinaatiolla tarkoitetaan tässä yhteydessä ilmiötä, jossa vasta-aineiden ja antigeenien muodostamat kompleksit kerääntyvät yhteen kasaumaksi. Agglutinaatio johtaa näyteliuoksen samenemiseen. Samenemisella on suora vaikutus näytteen läpi kulkevan valon määrään ja intensiteettiin, joita mitataan spektrofotometrisesti. Näytteen konsentraatio on suoraan verrannollinen näytteen absorbanssiin tietyllä aallonpituudella pitoisuusalueella. [32.] Immunoturbidimetrinen spektrofotometrinen analyysi perustuu myös absorbanssin mittaamiseen.

Immunoturbidimetriset analyysit voidaan jakaa kahteen tyyppiin: suoraan ja partikkeliavusteiseen turbidimetriaan. Suorassa immunoturbidimetriassa vasta-aineet muodostavat immunokompleksin yhdistymällä vasta-ainetta vastaavan

antigeenin kanssa. Partikkeliavusteisessa immunoturbidimetriassa partikkelit on pinnoitettu vasta-aineella, joka muodostaa näytteessä olevan antigeenin kanssa immunokompleksin. Partikkeliavusteisen immunoturbidimetrian etuna on pientenkin antigeenipitoisuuksien onnistunut detektoiminen näytteestä. Partikkelit, joihin vasta-aine on kiinnitetty, suurentavat muodostuvia immunokomplekseja ja voimistavat agglutinaatioreaktiota. Suurempi agglutinaatio johtaa suurempaan näytteen sameutumiseen ja täten vaikuttaa saatavaan signaaliin. Näistä syistä partikkeliavusteista immunoturbidimetriaa voidaan pitää erittäin herkkänä tutkimusmenetelmänä, joka soveltuu myös hyvin pienten pitoisuuksien analysoimiseen. [32.] Suoran immunoturbidimetrian ja partikkeliavusteisen turbidimetrian periaatteet on visualisoitu alla kuvassa 9.



Kuva 9 Vasemmalla suora immunoturbidimetria, jossa vasta-aine kiinnittyy antigeeniin. Oikealla partikkeliavusteinen immunoturbidimetria, joissa partikkeli on pinnoitettu vasta-aineella, joka yhdistyy antigeeniin. [32.]

## 4 Tutkimusmenetelmät, näytteet ja testaus

### 4.1 Laitteet ja menetelmät

Opinnäytetyön kokeellisessa tutkimusosiossa hemoglobiiniimuotojen säilymistä selvitettiin kahdella mittalaitteella, ThermoFisher Scientific Oy:n NanoDrop™ One C Microvolume UV–Vis -spektrofotometrin sekä vieritestauksessa käytettävän in-vitro QuikRead go -diagnoosiikkalaitteen avulla.

#### 4.1.1 Nanodrop One C

Nanodrop-laite toimii spektrometrian periaatteen mukaisesti. Tässä työssä Nanodrop-laitteella mitattiin käyttäen pisaratekniikkaa, jossa näyte pipetoitiin näytejalustalle ja mittauskäsivarsi laskettiin kiinni jalustaan. Jokaiselle näytteelle suoritettiin viisi rinnakkaista mittausta.

Nanodropille luotiin hemoglobiinin tutkimiseksi oma menetelmä tutkimusartikkelien pohjalta [29; 30; 31]. Ekstinktiokertoimena käytettiin  $524\ 280\ \text{mol/l}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ja hemoglobiinille asetettiin molekyylipainoksi 64,5 kDa. Nanodrop One C -laitteen omassa kustomoitavassa metodissa hemoglobiinimittauksille suositeltiin methemoglobiinille mittausaallonpituutta 406 nm ja oksihemoglobiinille puolestaan aallonpituutta 414 nm. Kustomoitavan metodin menetelmäkuvauksessa nämä aallonpituudet optimoitiin näytteille, joiden pitoisuudet olivat 0,125-4 mg/ml. [33,34.] Alla taulukossa 5 on esitetty opinnäytetyön mittauksissa käytetyt aallonpituudet hemoglobiinin tietyille hemoglobiinien hapetusasteille oletettujen absorbanssimaksimikohtien mukaisesti.

Taulukko 5. Mittausaallonpituudet hemoglobiinin eri hapetusmuodoille. [30, 34.]

Hemoglobiinin hapetusaste	$\lambda$ (nm)
Methemoglobiini	405,406, 407
Oksihemoglobiini	414, 415, 416
Deoksihemoglobiini	429, 430, 431

#### 4.1.2 QuikRead go

QuikRead go-laite on vieritestauksessa käytettävä *in vitro*-diagnostiikkalaite perusterveydenhuollon käyttöön. Laitteella voidaan analysoida yhteensopivien testikittien avulla useita analyyttejä potilasnäytteistä. QuikRead go-laitteen toiminta perustuu immunoturbidometriseen ja fotometriseen mittaukseen. Myös QuikRead go-laitteella suoritettiin kullekin olosuhteenäytteelle viisi rinnakkaismittausta.

QuikRead go iFOBT-testikittiä käytetään ulostenäytteen piilevän veren määrittämiseen. Tuotenimi iFOBT viittaa testin toimintamekanismiin ja lyhenne tulee sanoista Immunochemical Fecal Occult Blood Test.

Näytteenotin painetaan ulostenäytteeseen, minkä jälkeen se asetetaan näyteputkeen, jossa näyte esilaimennetaan. Esilaimennettua näytettä lisätään kyvetiin, jossa on mittauspuskuriliuos. Kyvetin päälle lisätään reagenssikorkki ja kyvetti syötetään korkkeineen QuikRead go-laitteeseen. Näytteeseen vapautetaan mikropartikkeleita, jotka on pinnoitettu eläinperäisellä humaanin hemoglobiinin vasta-aineella. Näytteen hemoglobiini reagoi hemoglobiinille spesifisen vasta-aineen kanssa muodostaen agglutinaatiokompleksin. Hemoglobiinille spesifinen vasta-aine takaa sen, että testissä muut mahdollisesti häiritsevät tekijät on poissuljettu. QuikRead go-laitte mittaa agglutinaation perusteella hemoglobiinin pitoisuutta ja tuottaa näytölle valittujen asetusten mukaisesti tulokset yksiköissä ng/ml (puskurissa), µg/g (ulosteessa) tai kvalitatiivisen POSITIIVINEN FOB -tekstin. [35.]

## 4.2 Näytteet

Kokeellinen laboratorio-osuus jakautui liuossäilyvyyden sekä syväjäähäpakkamisen jälkeiseen säilyvyyden tutkimiseen.

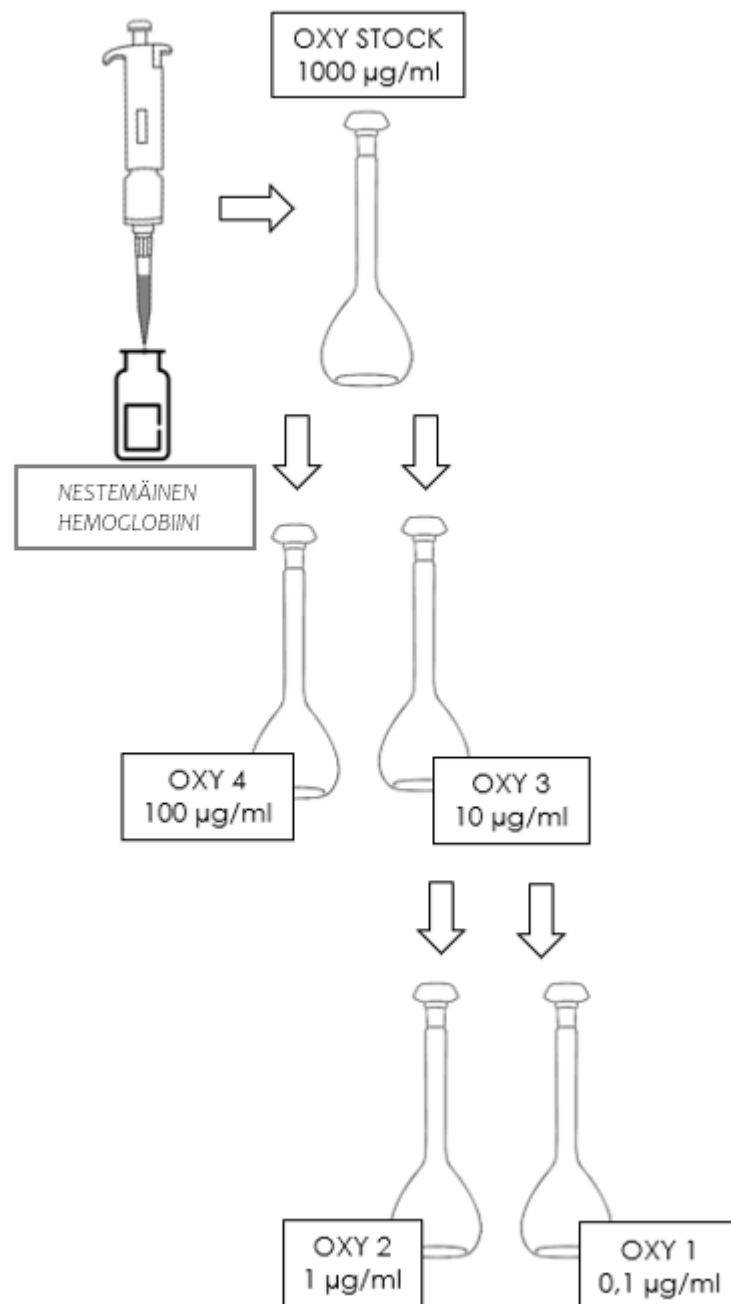
Liuossäilyvyydestestauksessa tutkittiin näytteiden hemoglobiinin säilyvyyttä heti liuosnäytteen valmistamisen jälkeen. Pakastesäilyvyyttä tutkittiin pakastuksen ja sulatuksen läpikäyneistä näytteistä. Näytteet valmistettiin kahdesta eri hemoglobiinimateriaalista, nestemäisestä oksihemoglobiinista ja jauhemaisesta kiinteästä methemoglobiinista. Lämpötilan vaikutuksen arvioimiseksi osa näytteistä säilytettiin pakastamisen jälkeen testauksien ajan huoneenlämmössä ja osa jääkaappilämpötilassa. Valon vaikutusta näytteen säilyvyyteen tutkittiin siten, että osa näytteistä säilytettiin valolta suojattuna ja osa altistettiin valolle kontrolloidusti. Tutkimuksessa käytettiin viittä eri pitoisuustasoa sekä yhtä nollanäytettä. Näytteiden pitoisuudet on ilmoitettu taulukossa 6.

Taulukko 6. Näytteiden pitoisuudet

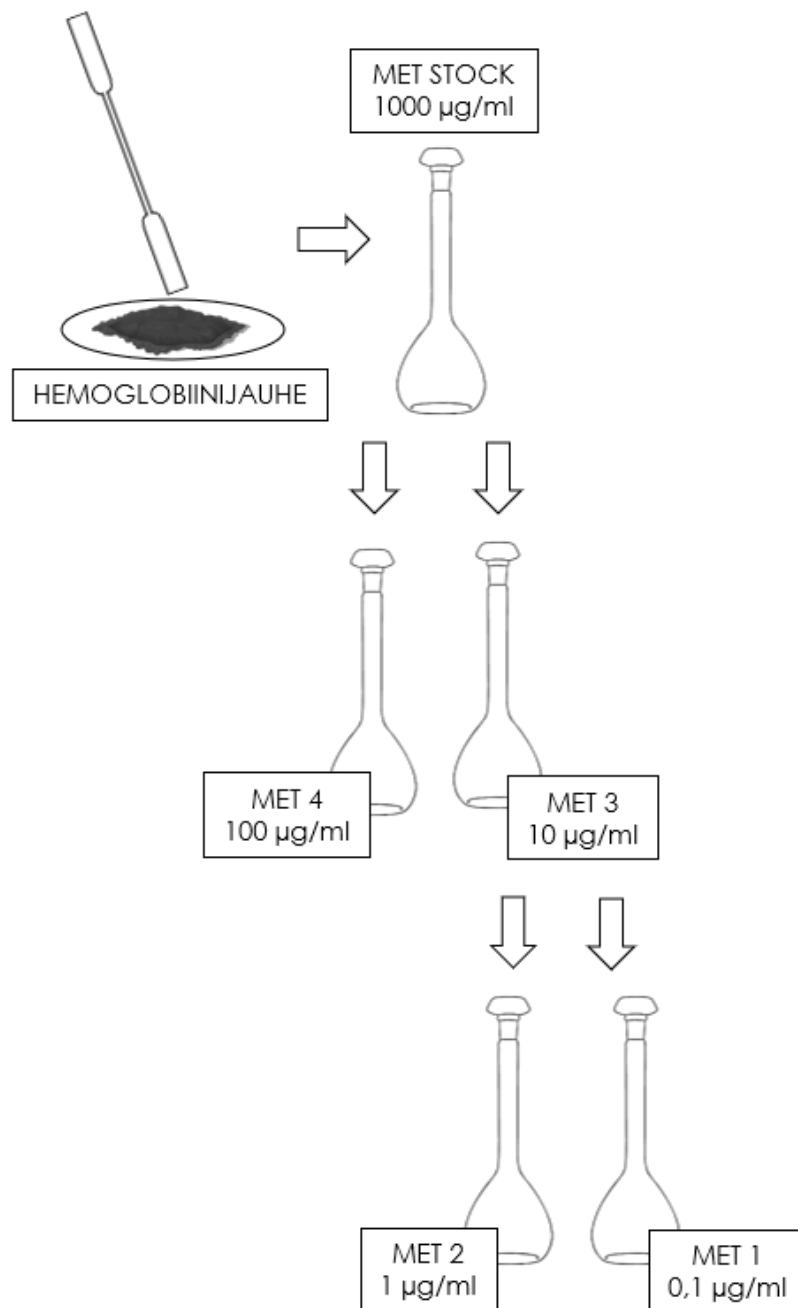
<b>Näyte</b>	<b>Hemoglobiinipitoisuus (µg/ml)</b>
BUF	0
MET/OXY 1	0,1
MET/OXY 2	1
MET/OXY 3	10
MET/OXY 4	100
MET/OXY STOCK	1000

#### 4.2.1 Liuossäilyvyysnäytteet

Kaikki näytteiden valmistamisessa käytetyt materiaalit nostettiin huoneenlämpöön temperoitumaan ennen liuosten tekemisen aloittamista. Kaikkeen pipetoimiseen käytettiin käänteistä pipetointitekniikkaa. Hemoglobiinimateriaaleista tehtiin ensin kantaliuos puskuriliuokseen, joka hemolysoi kaikki näytteen punasolut. Tämän jälkeen laimennoksiin käytettiin puskuriliuosta. Oksihemoglobiininäytteiden valmistus on esitetty kuvassa 10 ja methemoglobiininäytteiden valmistus vastaavasti kuvassa 11.



Kuva 10 Oksihemoglobiinin näyteliuosten valmistus nestemäisestä oksihemoglobiinista. Kaikki näyteliuokset siirrettiin valmistuksen jälkeen mittapulloista säilöpulloihin säilyvyydestä varten.



Kuva 11 Methemoglobiinin näyteliuosten valmistus. Hemoglobiinjauhe liotettiin ensin puskuriliuokseen, minkä jälkeen se suodatettiin. Suodatettu liuos laimennettiin MET STOCK-näytteeksi. Lopuksi kaikki näyteliuokset siirrettiin säilöpulloihin säilyvyydestä varten.

Säilöpullot etiketöitiin näytetunnuksin ja siirrettiin tutkittavaan säilytysolosuhteisiin. Liuossäilyvyyden näytteet jaettiin valolle altistettaviin näytteisiin sekä pimeässä valolta suojattuna säilytettäviin näytteisiin. Valolta suojattavat näytteet säilöttiin säilöpulloissa kannelliseen mustaan valotiiviiseen laatikkoon. Valolle altistettavat säilöpullot puolestaan säilytettiin kirkaassa kannettomassa laatikossa. Laatikkokokonaisuudet jaettiin lopulta huoneenlämmössä ja kylmässä säilytettäväksi.

#### 4.2.2 Pakastenäytteiden säilyvyys

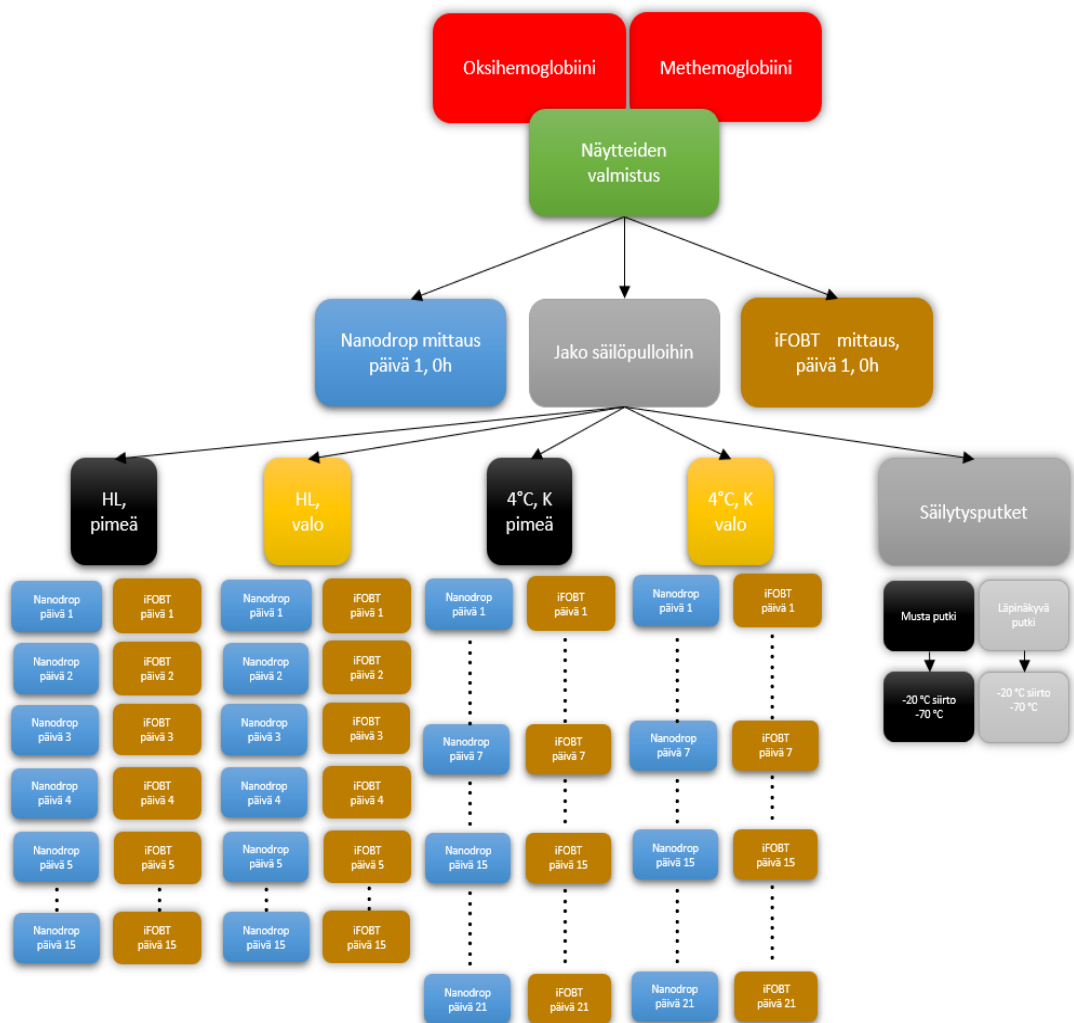
Pakastamisen jälkeistä säilyvyyttä varten kaikkia liuossäilyvyyden näytetasoja annosteltiin mustiin sekä läpinäkyviin mikrosentrifugiputkiin. Putket etiketöitiin näytetunnuksin ja siirrettiin  $-20\text{ °C}$ :n pakastinlämpötilaan. Putket olivat  $-20\text{ °C}$ :n lämpötilassa muutaman vuorokauden ajan, kunnes koeputket pakattiin minigrip-pusseihin ja siirrettiin  $-20\text{ °C}$ :n lämpötilasta  $-70\text{ °C}$ :n syväjäähdytyskammioon. Näytteiden vaiheittainen porrastettu pakastaminen suoritettiin, jotta syväjään kokonaislämpötila ei nousisi usean huoneenlämpöisen näytteen vaikutuksesta.

Näytteet olivat  $-70\text{ °C}$  syväjäähdytyskammiossa pakastettuina 7 päivää ennen sulatusta. Näytteiden sulatus toteutettiin siten, että  $-70$ -asteiset näytteet otettiin suoraan huoneenlämpöön sulamaan lämpötilakontrolloituun laboratorioon. Näyteputkien annettiin sulaa ja mikrosentrifugiputken näyte sulaa kiinteästä muodosta nesteeksi alle puolessa tunnissa. Sulatustavalla pyrittiin simuloimaan työprosessin vaihetta, jossa näytteet otettaisiin suoraan käyttöön pakastuksesta.

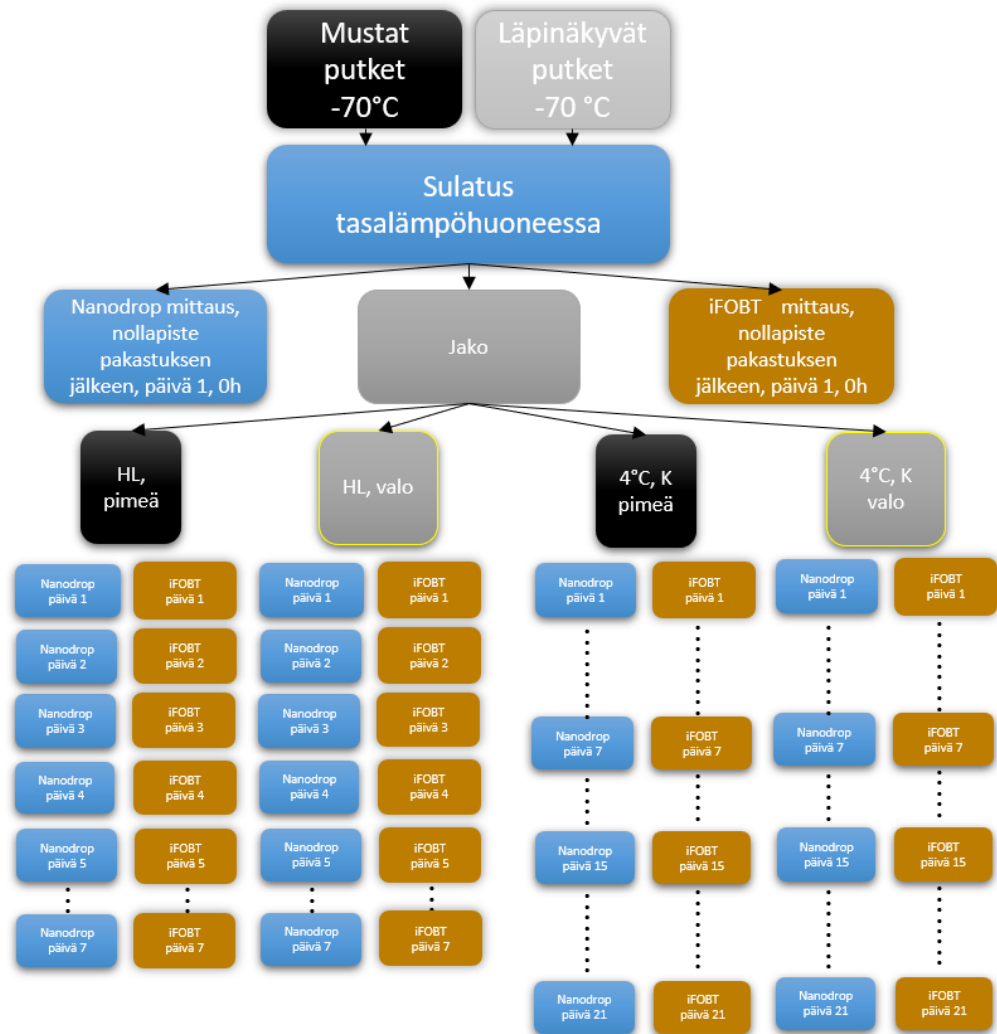
Sulatuksen jälkeen mikrosentrifugiputket säilytettiin koeputkitelineissä eri säilytysolosuhteille altistettuina. Valolle altistettavat näytteet säilytettiin kirkkaissa mikrosentrifugiputkissa sekä vastaavasti pimeä, valolta suojattu olosuhde, luotiin putkiin käyttämällä mustaa mikrosentrifugiputkea, jonka seinämien läpi ei pääse valoa. Huoneenlämpötilanäytteet säilytettiin valmistussäilyvyysliuosten kanssa samalla tavalla, lämpötilakontrolloidun laboratorion työpöydällä.

### 4.3 Testaus

Kokeellisen osuuden aikana näytteet merkittiin kolmiosaisella tunnuksella, josta ilmeni näytteen olosuhdealtisteet. Esimerkkinä näytemerkintä L-HL-P tarkoitti, että näytettä säilytettiin liuksena (L), huoneenlämmössä (HL) ja pimeässä (P). Vastaavasti pakastamista varten eppendorffputkiin annosteltu näyte (A), jota säilytettiin kylmässä (K) valolle alttiina (V) merkittiin tiedoilla A-K-V. Alla kuvissa 12 ja 13 on esitetty tutkimuksen kulku kaaviomuodossa.



Kuva 12 Liuossäilyvyyden tutkimuskaavio



Kuva 13 Pakastesäilyvyyden tutkimuskaavio

## 5 Liuossäilyvyydetutkimustulokset

### 5.1 Nanodrop-tulokset

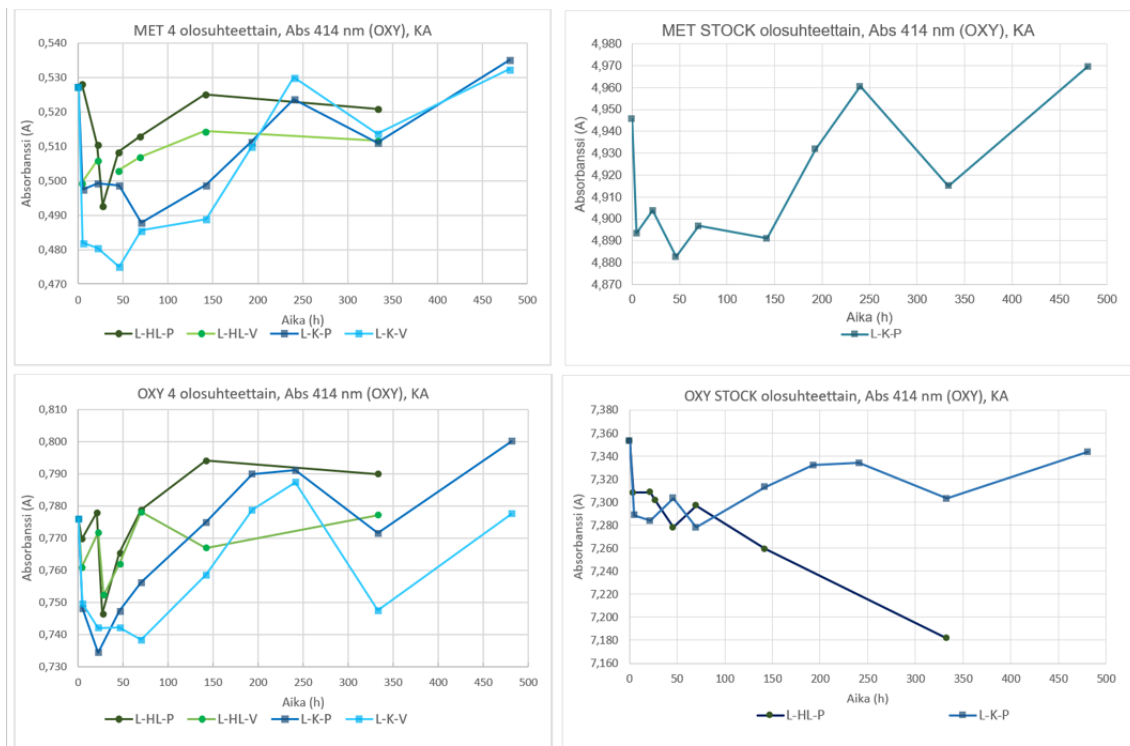
Tässä aluvussa käsitellään Nanodrop-laitteen absorbanssituloksia, absorbanssituloksille suoritettuja t-testien tuloksia sekä spektrejä, joiden avulla seurattiin oksihemoglobiinin mahdollista muuttumista methemoglobiiniksi.

Nanodrop -laitteen mittausalue kattaa näytteet, joiden pitoisuus on 100-1000 µg/ml. Taulukon 6 näytteistä valittiin näytteet MET/OXY 4 ja MET/OXY STOCK,

joiden pitoisuudet asettuvat hemoglobiinin määritysmenetelmän toiminta-alueelle.

### 5.1.1 Nanodrop–absorbanssit ja t-testit

Nanodropin mittausohjelmaan analyysiaallonpituus asetettiin 414 nm:iin. Alla kuvassa 14 on esitetty kootusti näytteiden Met 4, Oxy 4, Met Stock ja Oxy Stock absorbanssikuvaajat kaikkine olosuhdevariantteineen.



Kuva 14 Absorbanssitulosten keskiarvot aallonpituudella 414 nm. Jokainen piste on viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvo. Ylävasen: Met 4, alvasen: Oxy 4, yläoikea: Met Stock, alaoikea: Oxy Stock. L-HL-P-lyhenteellä viitataan liuosnäytteeseen, jota säilytettiin huoneenlämmössä pimeässä. L-HL-V viittaa liuosnäytteeseen, jota säilytettiin huoneenlämmössä valolle altistettuna. L-K-P-lyhenne tarkoittaa liuosnäytettä, jota säilytettiin kylmässä ja pimeässä. L-K-V-lyhenne viittaa liuosnäytteeseen, jota säilytettiin kylmässä valolle altistettuna.

Kuvassa 14 vasemmalla puolella näytetason 4 (100µg/ml) näytteiden osalta jokaisessa olosuhteessa havaittiin hajontaa eli kuvaajat eivät muodostaneet mitään tiettyä trendiä, vaan absorbanssipisteet vaikuttivat jakautuvan

sattumanvaraisesti. Kylmässä säilytettyjen tason 4 näytteiden absorbanssitulokset olivat keskimäärin matalampia kuin huoneenlämmössä säilytettyjen näytteiden. Kaikissa kahdeksassa näytetason 4 kuvaajassa havaittiin yhteinen ilmiö ensimmäisten mittauspisteiden osalta, kun absorbanssiarvot näyttävän laskevan aikavälillä 0-22h visuaalisesti kuvaajan muodosta arvioiden.

Kuvan 14 oikealla puolella Stock -pitoisuustason kylmäsäilytetyissä näytteissä havaittiin sekä methemoglobiinin että oksihemoglobiinin osalta lasku heti 4 tunnin kohdalla, jonka jälkeen arvo hakeutui takaisin lähtöabsorbanssin tuntumaan kylmäsäilytettyjen näytteen osalta. Oksihemoglobiinin huoneenlämmössä säilytetty Stock -näyte ei palautunut lähtöabsorbanssin tasolle.

Pelkästään kuvaajien muotoa tarkastelemalla ei voitu tehdä johtopäätöksiä näytteiden säilyvyydestä absorbanssituloksien suuresta hajonnasta johtuen. Tästä syystä absorbanssituloksille suoritettiin kaksisuuntainen t-testi olettaen varianssit yhtä suuriksi. [36.] T-testin avulla pyrittiin selvittämään olivatko kuvaajissa näkyvät absorbanssien mittaustulosten erot merkittäviä lähtötasoon verrattuna. P-arvoksi valittiin 0,05 eli luottamustaso 95 %. Nanodrop t-testitulokset liuosnäytteille Met 4, Oxy 4, Met Stock ja Oxy Stock ovat liitteessä 1.

Tason 4 näytteissä ei tapahtunut merkittävää muutosta lähtötasoon nähden. Tason 4 näytteiden sattumanvaraiset p-arvon alitukset eivät antaneet selkeää yksiselittäistä vastausta näytteiden säilyvyydestä.

Stock näytteiden t-testitulokset alittivat p-arvon jokaisessa olosuhteessa. Taustalla epäiltiin olevan systemaattinen virhe, joka johtui mahdollisesti verrattavan 0-pistenäytteen laadusta. Trendiä muodostanelle näytteelle Oxy Stock L-HL-P-näytteelle tehtiin samankaltainen kaksisuuntainen t-testi olettaen varianssit yhtäsuuriksi, mutta verraten 4 tunnin aikapisteeseen. Myös tämän näytteen t-testi löytyy liitteestä 1.

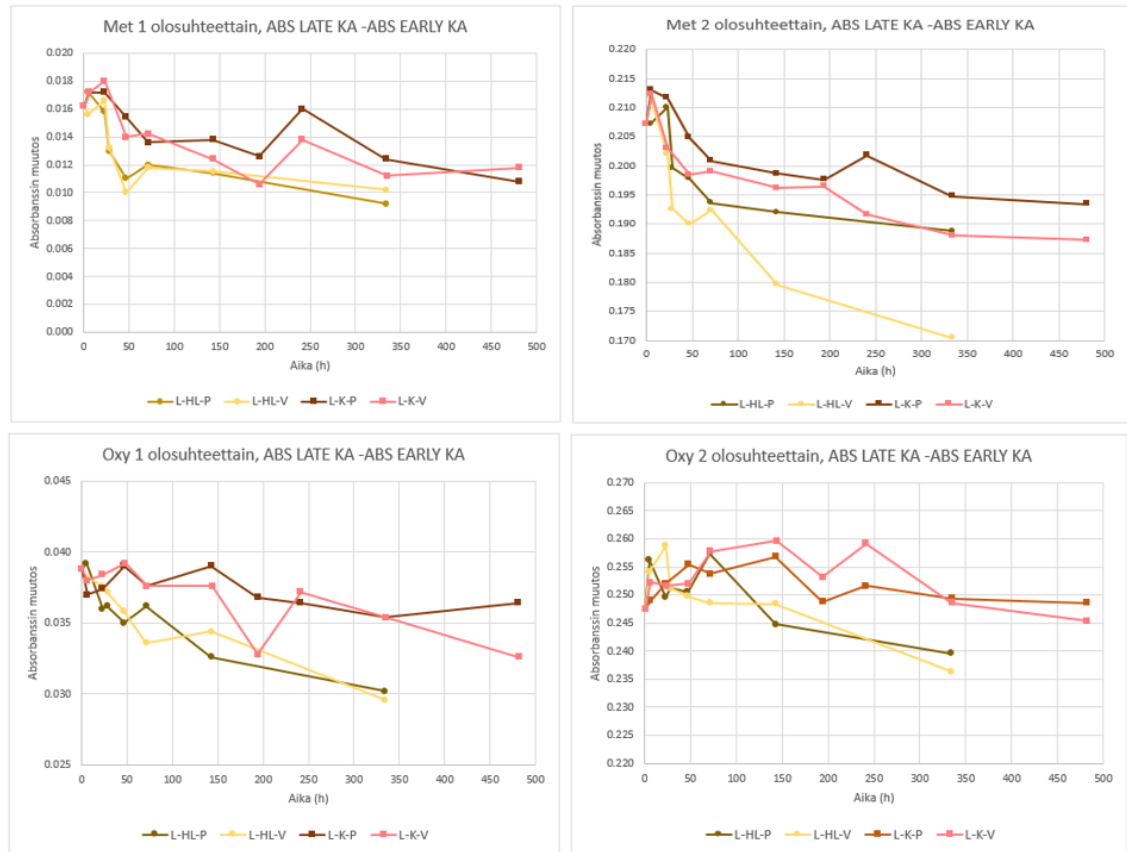
### 5.1.2 Nanodrop–spektrit

Nanodrop -laitteen ohjelmisto mahdollisti kokonaisten spektrien tarkastelun ja tulkinnan siten, että spektrien maksimi oli mahdollista määrittää kullekin spektrille erikseen. Viidestä rinnakkaisesta näytespektristä valittiin keskimääräinen tulos ja poimittiin absorbanssimaksimi sekä maksimia vastaava aallonpituus. Absorbanssimaksimien pohjalta tehtiin liitteen 2 taulukot, joissa on esitetty kullekin ajanhetkelle Nanodropin antama maksimiaallonpituus näytetason 4 näytteille.

Liitteen 2 maksimiabsorbanssikeskiarvojen pohjalta voidaan todeta, että maksimiaallonpituus ei juurikaan muutu. Maksimiaallonpituus vaihteli 417-418 nm.

### 5.2 QuikRead go–tulokset ja t-testit

QuikRead go tuloksissa huomioitiin näytetasot 1 ja 2, joiden pitoisuudet olivat 0,1 ja 1 µg/ml. Nämä näytteiden pitoisuudet osuvat parhaiten QuikRead go–laitteen ja QuikRead go iFOBT–testin mittausalueelle, jossa absorbanssia mitattiin reaktion alussa ja lopussa. Absorbanssin muutos saatiin vähentämällä reaktion alkuabsorbanssin keskiarvo loppuabsorbanssin keskiarvosta. Alla kuvassa 15 on esitetty kootusti QuikRead go:lla saadut absorbanssien muutokset näytetasojen 1 ja 2 tuloksille.



Kuva 15 Absorbanssien muutokset. Reaktion loppuabsorbanssin viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvosta vähennettiin alkuabsorbanssin viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvo, tästä nimitys ABS LATE ja ABS EARLY. Ylävasen: Met 1, alavasen: Oxy 1, yläoikea: Met 2 ja alaoikea: Oxy 2. L-HL-P tarkoittaa liuosnäytettä, jota säilytettiin pimeässä huoneenlämmössä. L-HL-V viittaa liuosnäytteeseen, jonka olosuhde oli huoneenlämmössä valossa. L-K-P-lyhenne tarkoittaa liuosnäytettä, jota säilytettiin kylmässä ja pimeässä. Vastaavasti L-K-V on liuosnäyte, jonka olosuhde oli kylmässä ja valossa säilytetty.

Kuvan 15 vasemmalla puolella Met 1-näytteessä huoneenlämpöabsorbanssit ja kylmäsäilytysabsorbanssit kulkivat ikään kuin ryhminä, selkeästi toisistaan erottuen lämpötilan osalta. Kumpaa tahansa lämpötilaolosuhdetta tarkastellessa vaikutti siltä, että näytteen Met 1 kohdalla valon vaikutus säilyvyyteen oli melko pieni. Oxy 1-näytteiden kuvaajissa näkyy osittain samantyyppistä ryhmittäytymistä huoneenlämpö- ja kylmäsäilytettyihin liuoksiin.

Kuvan 15 oikealla puolella näytteessä Met 2 olosuhteen L-HL-V kuvaaja vaikutti muodostavan laskevaa trendiä. Met 2 näytteen L-HL-P kuvaaja ei laske samaan

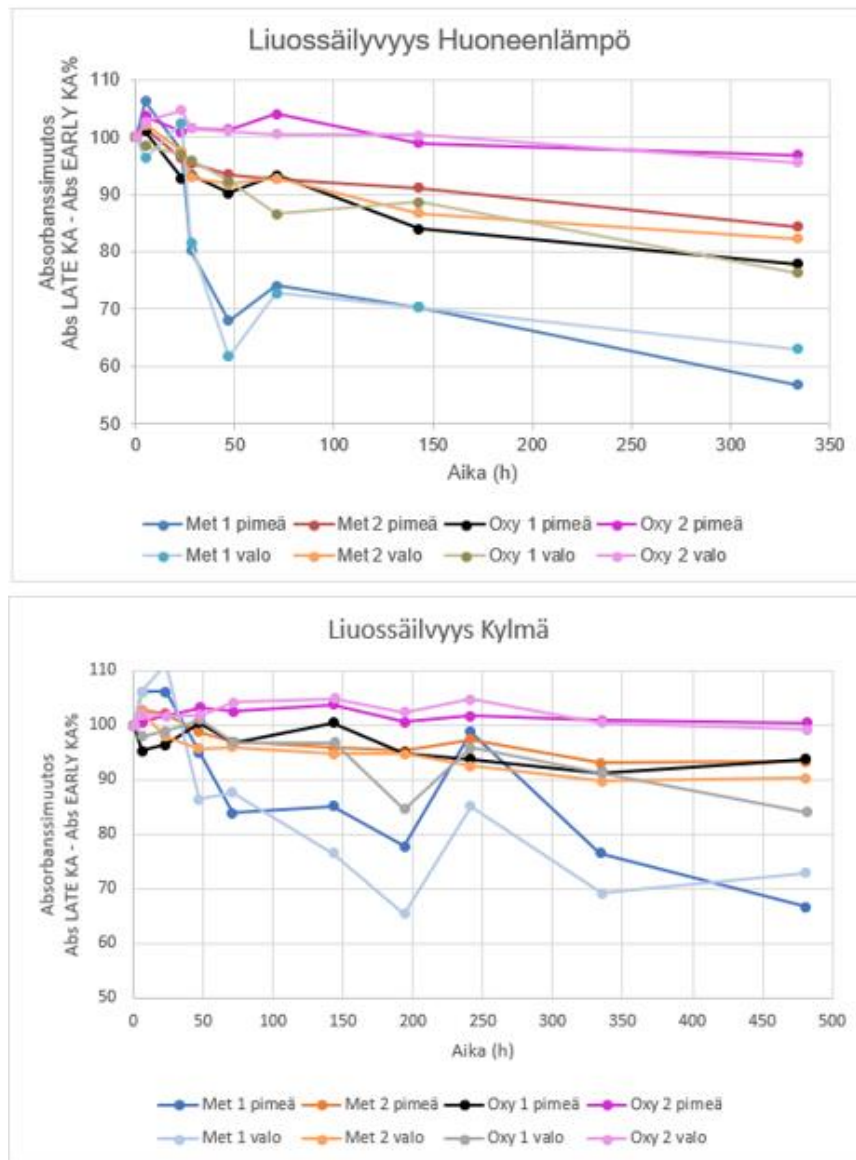
tapaan valossa altistetun näytteen kuvaajan tasolle. Oxy 2-näytteiden kuvaajissa ei vaikuttanut muodostuvan nousevia tai laskevia trendejä.

Kuvan 15 tuloksissa havaittiin variaatiota mittauspisteiden välillä. Näytteille toteutettiin absorbanssitulosten kaksisuuntainen t-testi olettaen varianssit yhtä suuriksi. [36.] T-testin avulla pyrittiin selvittämään ovatko kuvaajissa näkyvät absorbanssien mittaustulosten erot merkittäviä lähtötasoon verrattuna. Luottamustasoksi valittiin 95 %. QuikRead go liuosnäytteiden t-testien tulokset on esitetty liitteessä 3.

Liitteen 3 t-testituloksissa näytteiden Met 1, Oxy 1, Met 2 ja Oxy 2 kaikkien olosuhdevarianttien t-testituloksissa esiintyi joko p-arvon 0,05 systemaattinen alitus tai yksittäinen p-arvon alitus. Yhdenkään näytteen yksikään olosuhdevariantti ei ylittänyt p-arvoa systemaattisesti 478 tuntiin asti.

### 5.2.1 QuikRead go hemoglobiinimuutos

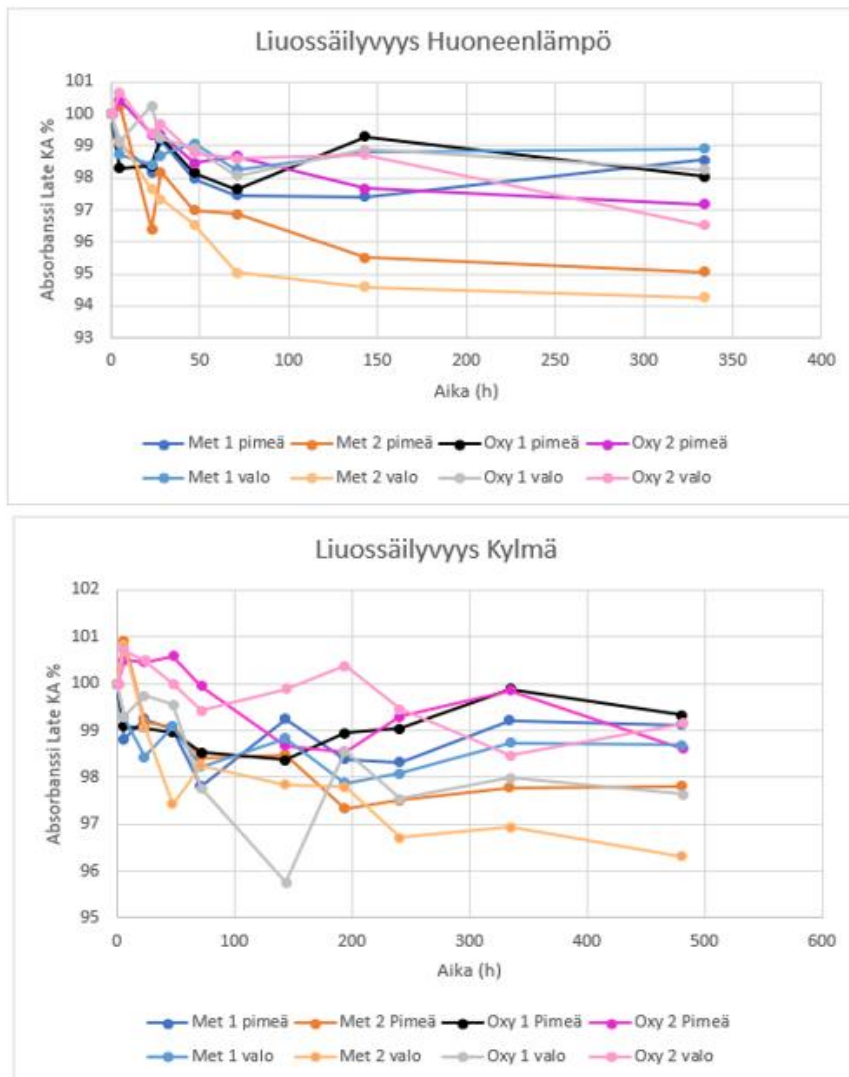
Alle kuvaan 16 koottiin QuikRead go-laitteen tuottamista tuloksista koostettuja kuvaajia, joissa tarkastellaan hemoglobiinin hajoamista prosentuaalisesti absorbanssin muutoksena ajan funktiona. QuikRead go-laitteen tuottamasta datasta poimittiin absorbanssimuutos eli erotus loppuabsorbanssin ja alkuabsorbanssin välillä, Abs LATE-Abs EARLY. 100 % kuvaa lähtötilannetta eli nollapistettä, jossa oletetusti näytteessä oleva hemoglobiini on kaikki tallella vielä näytteessä.



Kuva 16 Hemoglobiininpitoisuuden absorbanssin prosentuaalinen muutos. Yllä: huoneenlämpöolosuhde, alla: kylmäolosuhde. Absorbanssin muutos saatiin vähentämällä reaktion alkuabsorbanssin keskivaro loppuabsorbanssin keskiarvosta.

Kuvassa 16 havaittiin selkeästi toisista käyristä eroavat siniset Met 1-näytteen käyrät, jotka molemmissa lämpöolosuhteissa kulkivat muita käyriä alempana. Saman pitoisuustason 1 Oxy -näytteessä ei ole kuitenkaan havaittavissa samantyyppistä ilmiötä. Tason 2 näytteet sekä methemoglobiini- että oksihemoglobiininäytteiden hemoglobiini vaikuttavat laskevan lievästi.

Alle kuvaan 17 poimittiin QuikRead go:n loppuabsorbanssitulokset kohdasta ABS LATE, joka ilmaisee mitatun näytteen absorbanssin mittauksen lopussa. Loppuabsorbanssitulokset ovat suhteessa ensimmäiseen mittauspisteeseen ajanfunktiona. Reaktion loppuabsorbanssia tarkasteltiin absorbanssimuutosten rinnalla siitä syystä, että QuikRead go:n iFOBT-testi ei ole absorbanssimuutoksen, Abs Late – Abs Early-tuloksien osalta koko mittausmatkalta lineaarinen.



Kuva 17 Hemoglobiininpitoisuuden absorbanssin prosentuaalinen muutos. Yllä: huoneenlämpöolosuhde, alla: kylmäolosuhde. Pisteet ovat loppuabsorbanssin keskiarvotuloksia.

Loppuabsorbanssituloskuvaajia tarkastellessa kuvassa 17 absorbanssit eivät laske yhtä matalalle kuin 16 kuvaajat. Huoneenlämpöolosuhteissa kuvassa 17 alimmaksi laskee MET 2 valo -näytteen kuvaaja, mutta prosentuaalitasolla muutos pysyy kuitenkin 94 %:n yläpuolella.

Absorbanssimuutosta tarkastellessa korkeamman konsentraation omaavien näytteiden hemoglobiininpitoisuuden muutos vaikuttaisi olevan nopeampaa etenkin huoneenlämmössä. Loppuabsorbanssiarvoja tarkastellessa kuitenkin

vaikuttaisi siltä, että korkeamman pitoisuuden näytteellä muutos on selkeämpi kuin matalamman pitoisuuden näytteillä

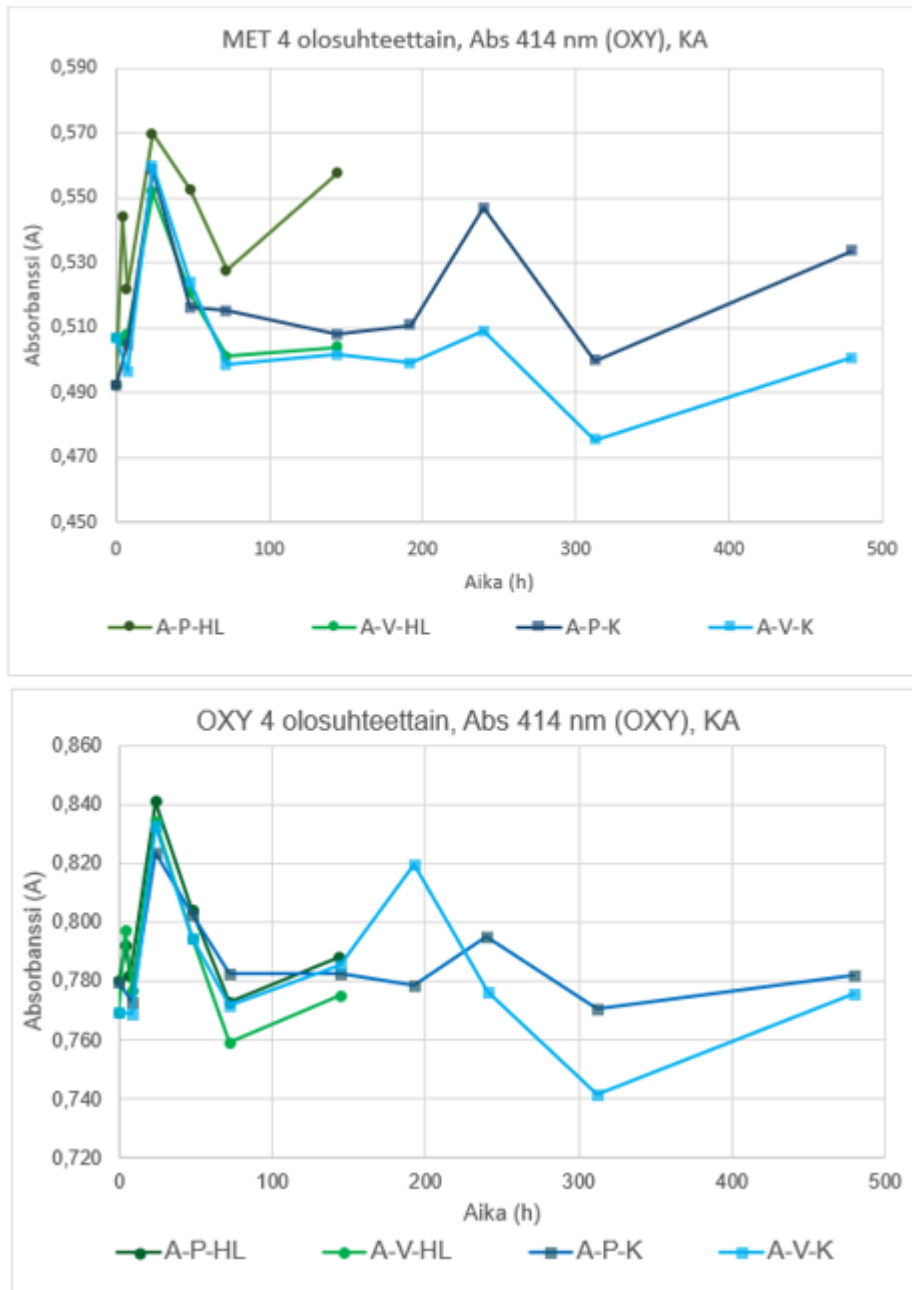
## **6 Pakastesäilyvyytutkimustulokset**

### 6.1 Nanodrop–tulokset

Pakastesäilyvyyden tulostarkasteluun valittiin näytetason 4 näytteet, joiden pitoisuudet olivat 100 µg/ml. Nämä näytteiden pitoisuudet osuvat parhaiten QuikRead go–laitteen ja QuikRead go iFOBT–testin mittausalueelle, jossa absorbanssia mitattiin reaktion alussa ja lopussa. Pakastesäilyvyyden tutkimisessa käytettiin samaa Nanodropille luotua ohjelmaa kuin liuossäilyvyyden tutkimisessa.

#### 6.1.1 Nanodrop–absorbanssit ja t-testit

Mittausohjelman analyysiaallonpituus asetettiin 414 nm. Alla kuvassa 18 on esitetty näytteiden Met 4 ja Oxy 4 absorbanssitulokset kaikkien olosuhdevarianttien osalta.



Kuva 18 Absorbanssitulosten keskiarvot aallonpituudella 414 nm. Jokainen piste on viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvotulos. Lyhenteellä A-P-HL viitataan näytteeseen, joka annosteltiin mikrosentrifugiputkeen ja jota säilytettiin pimeässä huoneenlämmössä. A-V-HL-lyhenne tarkoittaa vastaavasti annosteltua näytettä, jonka säilytysolosuhteet olivat valo ja huoneenlämpö. Lyhenne A-P-K viittaa annosteltuun näytteeseen, jota säilytettiin pimeässä ja kylmässä. A-V-K viittaa mikrosentrifugiputkeen annosteltuun näytteeseen, jota säilytettiin valossa ja kylmässä.

Kuvan 18 molemmissa Met- ja Oxy -näytteiden kuvaajissa kaikissa olosuhteissa säilytetyt näytteet vaikuttivat muodostavan keskenään kohtalaisen samanlaisia kuvaajia. Eroavuuksia alkoi näkymään vasta noin 72 tunnin jälkeen.

Visuaalisesti kuvaajista arvioitiin, että säilytysolosuhteilla ei vaikuttanut olevan havaittavaa merkitystä.

Kaksisuuntainen t-testi olettaen varianssit yhtä suuriksi suoritettiin myös näille näytteille. [36.] T-testin avulla pyrittiin selvittämään, olivatko kuvaajien absorbanssierot merkittäviä lähtötasoon nähden. Luottamustasoksi valittiin 95 %. Pakastettujen näytteiden t-testitulokset ovat liitteessä 4. Taulukoihin on korostettu punaisella värillä ne t-testitulokset, jotka alittavat p-arvon 0,05.

Liitteen 4 t-testien tulokset vaikuttivat siltä kuin 24 tunnin mittauspisteen kohdalla olisi tapahtunut mahdollisesti jokin systemaattinen virhe ja p-arvo alittuu. 72 tunnin kohdalla p-arvo ylittyy jälleen kaikissa säilytysolosuhteissa. 72 tunnista eteenpäin p-arvo ylittyy molemmissa Met 4:ssä ja Oxy 4:ssä kaikissa olosuhteissa mittauksien loppuun saakka.

### 6.1.2 Nanodrop–spekrit

Myös pakastesäilyvyyden mittauksista oli mahdollista poimia viidestä rinnakkaisesta näytespektristä keskimääräinen tulos ja määrittää sen maksimiabsorbanssia vastaava aallonpituus. Absorbansseista muodostettiin samaan tapaan maksimiaallonpituuksia ilmaisevat taulukot, jotka ovat esillä liitteessä 5.

Maksimiaallonpituudet vaihtelevat 417–418 nm. Liitteen 5 taulukot osoittivat, että pakastuksen jälkeinen maksimiaallonpituus on samalla tasolla kuin ennen pakastusta liuosnäytteiden säilyvyystutkimustuloksissa liitteessä 2.

## 6.2 QuikRead-go

Myös pakastuksen jälkeisen säilyvyyden tutkimisen tulostarkasteluun valittiin näytetasot 1 ja 2, joiden pitoisuudet olivat 0,1 ja 1 µg/ml. Nämä tulokset valittiin, sillä ne osuvat pitoisuuksiltaan QuikRead-laitteen toiminta-alueelle. Alla kuvassa 19 on esitetty QuikRead go:lla saadut absorbanssien muutokset, analyysin alku- ja loppuabsorbanssit mitatuissa aikapisteissä.



Kuva 19 Absorbanssien muutokset. Reaktion loppuabsorbanssin viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvosta vähennettiin alkuabsorbanssin viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvo. Ylävasen: Met 1, alavasen: Oxy 1, yläoikea: Met 2 ja alaoikea: Oxy 2. A-P-HL viittaa näytteeseen, joka on annosteltu mikrosentrifugiputkeen ja jota säilytettiin pimeässä huoneenlämpötilassa. A-V-K viittaa vastaavasti annosteltuun näytteeseen, jota säilytettiin valossa ja kylmässä. A-P-K-lyhenne tarkoittaa annosteltua näytettä, jota säilytettiin pimeässä ja kylmässä. A-V-K tarkoittaa annosteltua näytettä, jota on säilytetty valolle altistettuna kylmässä.

Kuvan 19 vasemmalla puolella molemmissa näytteissä sekä Met 1 ja Oxy 1 huoneenlämpönäytteet ja kylmänäytteet vaikuttivat kulkevan omaa rataansa:

huoneenlämpösäilyvydet alempana ja kylmäsäilyvydet selvästi erottuen korkeammalla. Molemmissa Met 1- ja Oxy 1 -näytteissä absorbanssin lasku havaittiin merkittävä lasku ensimmäisen kymmenen tunnin aikana. Näytteiden absorbanssimuutoksen pienentyminen vaikutti olevan hitaampaa, kun näytteitä säilytettiin kylmässä.

Kuvan 19 oikealla puolella olevien Met 2 -näytteiden absorbanssin muutoksen kuvaajat erosivat toisistaan eniten riippuen näytteen säilytyslämpötilasta. Kylmäsäilytetyt näytteet piirtyivät omina käyrinään huoneenlämpösäilytettyjen näytteiden käyrien yläpuolella.

Methemoglobiinista valmistettujen näytteiden absorbanssin muutoksen pienentyminen oli hitaampaa kylmässä säilytetyillä näytteillä kuin huoneenlämmössä säilytetyillä näytteillä. Oxy 2 -näytteiden absorbanssin muutoksen tarkastelussa havaittiin merkittävää hajontaa. Säilyvyysseurannan alun mittauspisteitä lukuunottamatta absorbanssin muutos säilyi kaemmin alkupistettä vastaavana kylmässä kuin huoneenlämmössä. Valolla ei todettu merkittävää vaikutusta tuloksiin.

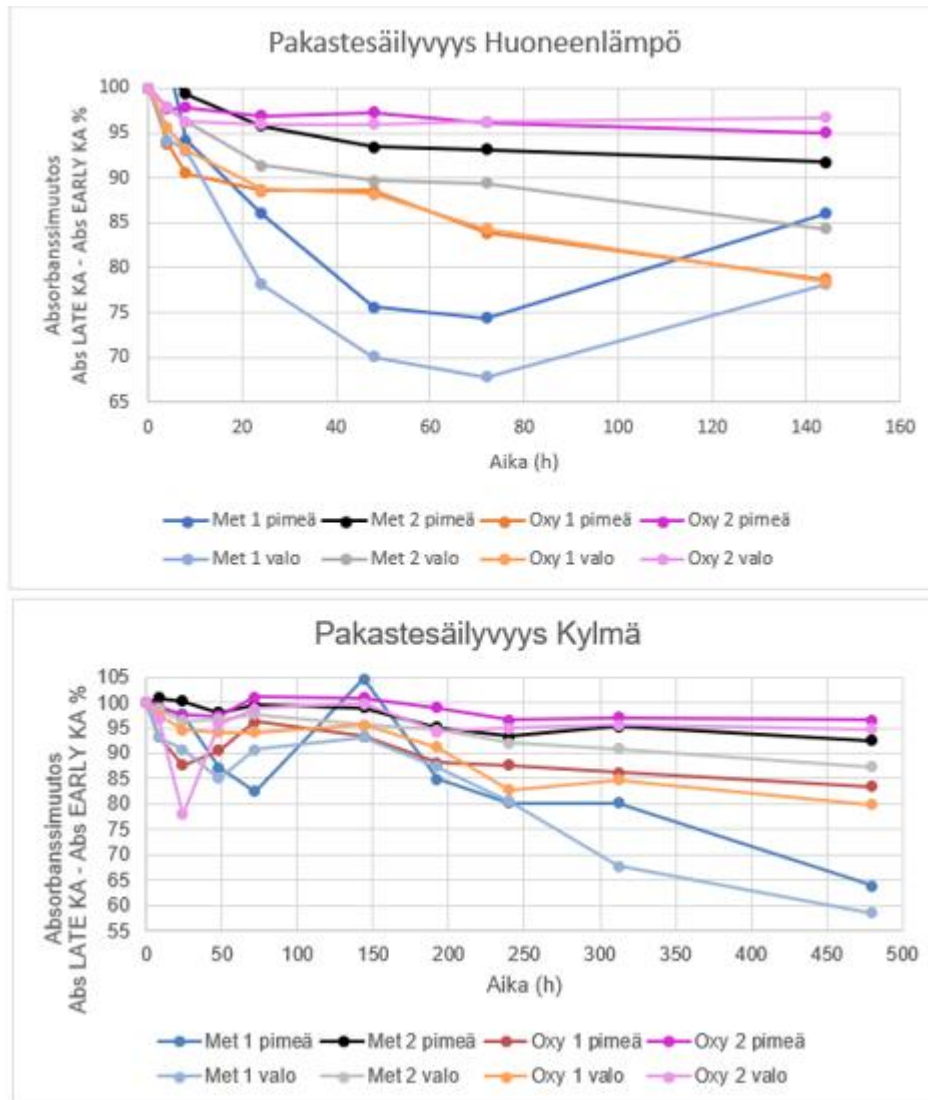
Absorbanssituloksille suoritettiin t-testit ja luottamustasoksi valittiin 95 %. [36.] Pakastesäilyvyyden QuikRead go tulokset on esitetty liitteessä 6. P-arvon 0,05 alittavat tulokset on korostettu punaisella värillä.'

Liitteen 6 t-testituloksia tarkastellessa huoneenlämmössä säilytetyillä Met 1 -näytellä havaittiin merkittävä ero absorbanssien muutoksessa suhteessa alkupisteeseen jo 24 tunnin mittauspisteen kohdalla. Kylmässä säilytettävillä näytteillä vastaava havaittiin systemaattisesti vasta 192 tunnin mittauspisteen jälkeen. Huoneenlämmössä säilytetyillä Oxy 1-näytteillä merkittävä ero havaittiin jo 8 tunnin mittauspisteen kohdalla. Kylmässä säilytetyillä näytteillä oli havaittavissa merkittävää hajontaa tuloksissa, mutta systemaattinen merkittävä ero havaittiin Met 1-näytettä vastaavasti vasta 192 tunnin mittauspisteen jälkeen.

Tarkastellessa kuvaa 19 ja liitteen 6 tuloksia yhdessä Met 2 - ja Oxy 2 -näytteille voitiin todeta, että näytteiden absorbanssin muutos säilyi parhaiten alkutilannetta vastaavana kylmässä. Yksin t-testien perusteella on mahdotonta tehdä johtopäätöksiä tietyistä pisteistä, jossa tuloksissa havaittaisiin merkittävä lasku.

### 6.2.1 QuikRead go -hemoglobiinimuutos

Alle kuvaan 20 koottiin QuikRead go laitteen mittausdatasta kuvaajia, joissa tarkastellaan hemoglobiinin pitoisuuden muuttumista prosentuaalisesti suhteessa aikaan.

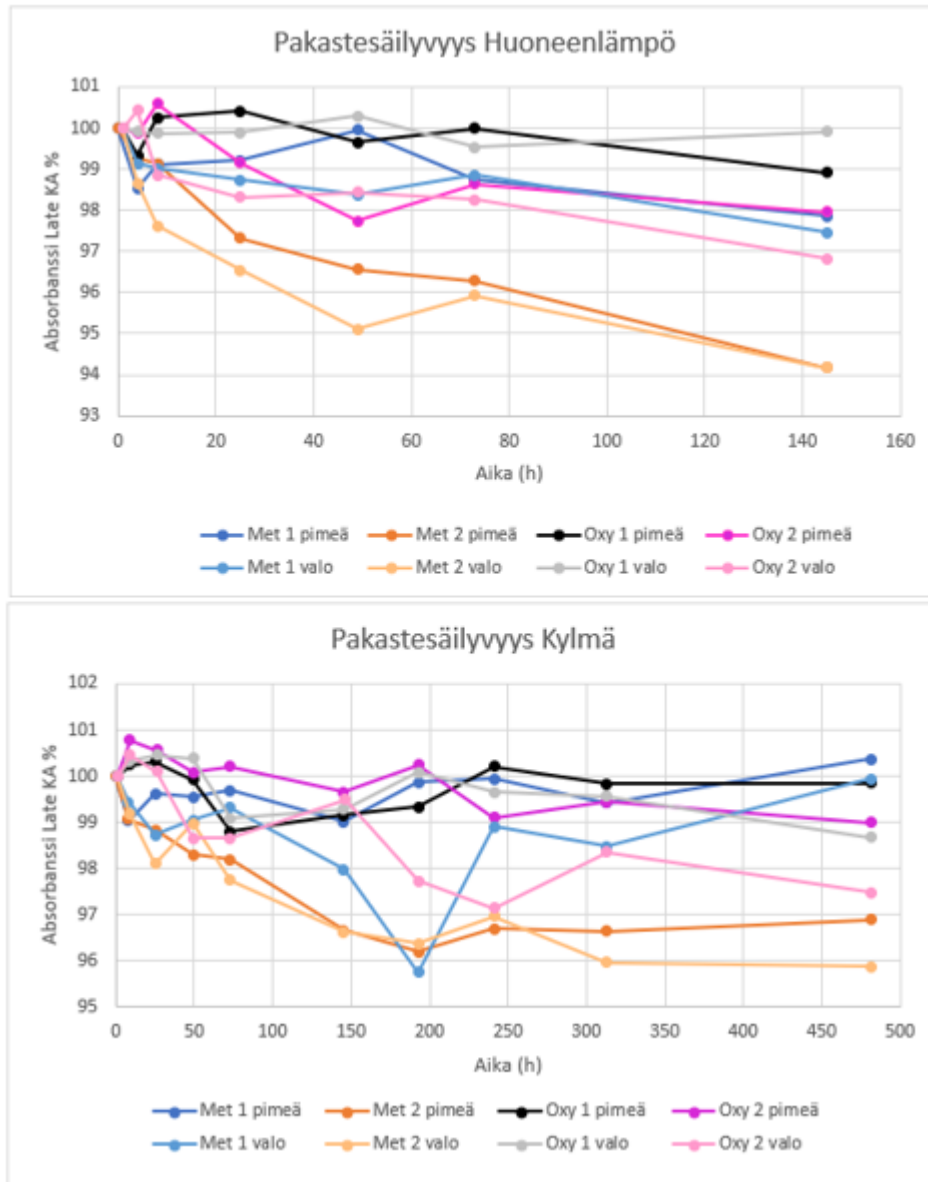


Kuva 20 Hemoglobiininpitoisuuden absorbanssin prosentuaalinen muutos. Yllä: huoneenlämpöolosuhde, alla: kylmäolosuhde. Absorbanssin muutos saatiin vähentämällä reaktion alkuabsorbanssin keskiarvo loppuabsorbanssin keskiarvosta.

Paketesäilyvyyden mittauksia jatkettiin pidemmälle kuin liuossäilyvyyden mittauksia. Kuvan 20 kuvaajissa erottui Met 1 näyte sinisine käyrineen, jotka laskivat selkeästi muita käyriä alemmaksi molemmissa sekä huoneenlämpö- että kylmäolosuhteissa.

Kuvassa 20 havaittiin samantyyppinen ilmiö kuin hemoglobiinin prosentuaalinen muutos liuossäilyvyyden käyrissä kuvassa 16. Matalamman konsentraation näytteet Met 1 ja Oxy 1 menettivät hemoglobiinia nopeammin verrattuna tason 2 näytteisiin.

Alle kuvaan 21 poimittiin QuikRead go:n absorbanssitulokset mittausdatasta kohdasta ABS LATE, joka ilmaisi mitatun näytteen absorbanssin mittauksen lopussa. Abs LATE tuloksia tarkasteltiin Abs LATE – Abs EARLY tulosten rinnalla siitä syystä, että QuikRead go:n iFOBT-testi ei ole Abs LATE – Abs Early tuloksien osalta koko mittausmatkalta lineaarinen.



Kuva 21 Hemoglobiininpitoisuuden absorbanssin prosentuaalinen muutos. Yllä: huoneenlämpöolosuhde, alla: kylmäolosuhde. Pisteet ovat loppuabsorbanssin keskiarvotuloksia.

Molemmissa lämpötilaolosuhteissa kuva 21 kaikissa kuvaajissa absorbanssi pysyy 90 %:n yläpuolella. Alimpana kuitenkin molemmissa kuvaajissa esiintyy Met 2 näytteet.

## 7 Johtopäätelmät ja kehityskohdat

Työn tavoitteena oli arvioida ja tutkia hemoglobiinin hapetusasteiden vaikutusta standardiliuosten säilyvyyteen. Eri hemoglobiinimateriaalista valmistettujen standardien säilyvyyden tutkiminen parantaisi sekä helpottaisi Aidian Oy:n tuotannon työprosesseja sekä lyhentäisi merkittävästi työhön käytettyä aikaa.

### 7.1 Johtopäätelmät

Nanodrop -liuossäilyvyyšnäytteiden t-testit eivät anna selkeää yksiselitteistä vastausta liuksen säilyvyydestä. Huoneenlämmössä ja pimeässä säilytetty näytetason 4 eli pitoisuudeltaan 100 µg/ml methemoglobiininäytteen t-testitulokset säilyvät luottamustason 95 % yläpuolella. Tämän liuosnäytteen voidaan katsoa säilyneen tässä olosuhteessa 334 tuntiin asti. Muut liuosnäytteiden, 100 ja 1000 µg/ml t-testitulokset alittavat luottamustason 95 % joko systemaattisesti tai yksittäisten aikapisteiden osalta.

Nanodrop -pakastesäilyvyyšnäytteiden t-testitulokset antavat jokainen ikään kuin systemaattisen p-arvon alituksen 24 tunnin kohdalla. Pakastesäilyvyyden arvioiminen ei ole näiden t-testitulosten avulla mahdollista.

Nanodrop -laitteen tuottamien maksimiabsorbanssitulosten avulla voidaan todeta, että saadut tulokset eivät tue työn alussa esitettyä hypoteesia oksihemoglobiinin spontaanista auto-oksidaatiosta. Oksihemoglobiinin hapetusaste ei muuttunut methemoglobiiniksi yhdessäkään olosuhdealtistekombinaatiossa liuossäilyvyyden eikä pakastesäilyvyyden osalta. Maksimiabsorbanssi vaihteli aallonpituudella 417-418. Jos oksihemoglobiini olisi alkanut muuttumaan methemoglobiiniksi, olisi tuloksissa ollut havaittavissa maksimiabsorbanssiarvon siirtyminen kohti 405-407 nm:n aallonpituusalueita.

QuikRead go t-testitulokset viittaavat siihen, että hemoglobiininäytteet eivät säily yksiselitteisellä ja luotettavalla tasolla liuosnäytteinä, sillä t-testitulokset alittavat p-arvoa sekä satunnaisesti että systemaattisesti kaikissa olosuhteissa.

Pakastenäytteistä 1 µg/ml näyte, sekä methemoglobiini että oksihemoglobiini, vaikuttavat säilyvän parhaiten ja pisimpään kylmässä ja pimeässä olosuhteessa sulatuksen jälkeen. Methemoglobiini säilyi 144 ja oksihemoglobiini puolestaan 192 tuntia. Näiden aikapisteiden jälkeen p-arvo alittuu systemaattisesti. Kaikki havaitut muutokset varsinaisissa absorbanssituloksissa olivat kuitenkin melko pieniä etenkin kylmässä säilytetyillä näytteillä, joten t-testeillä määritetty merkittävä ero ei ole välttämättä vielä merkittävä näytteelle määritetyn hemoglobiinipitoisuustuloksen kannalta.

## 7.2 Kehityskohdat

Tässä luvussa analysoidaan projektin aikana sekä tuloksien pohjalta mahdollisia kehityskohtia sekä esitetään keinoja, joiden avulla projektin tuloksista olisi voitu mahdollisesti saada johdonmukaisempia ja laadullisesti parempia.

### 7.2.1 Lähtömateriaalit

Tulokset osoittavat, että molemmat sekä methemoglobiini että oksihemoglobiini ovat hapetusmuodoiltaan oksihemoglobiinia. Tämä käy ilmi Nanodrop spektrien maksimiabsorbanssituloksista. Hemoglobiinireagenssin valmistajan lausunto usein kysytyjen kysymysten osiosta reagenssin methemoglobiinin osuudesta:

Onko tuote H7379, Humaanihemoglobiini, methemoglobiinia?

Kyllä. Rauta hemoglobiinissa hapettuu altistuessaan ilmalle ellei tuotetta käsitellä ja pakata oikein. Tuote altistuu ilmalle puhdistus- ja pakkausprosessin aikana, joten se sisältää pääsääntöisesti methemoglobiinia. [37.]

Reagenssin valmistajan väite on ristiriidassa Nanodropin antamien spektritulosten kanssa.

Mahdollista näytekuriliuoksen vaikutusta hemoglobiinin hapetusasteeseen on vaikea arvioida. Puskurin vaikutusta tuloksiin ei voida kuitenkaan täysin

poissulkea, sillä se on mahdollisesti vaikuttanut molemmilla metodeilla saatuihin mittaustuloksiin.

### 7.2.2 Temperointikäytännöt

Tuloksissa havaittavat absorbanssien hajonta olisi saatu mahdollisesti minimoitua, jos liuosten mittaustilapötiloja olisi seurattu tai mittaaminen olisi aloitettu vasta silloin, kun liuos olisi saavuttanut tietyn lämpötilan.

Kylmäsäilytettöjen näytteiden tulosvariaation selittäväenä tekijänä voidaan mahdollisesti pitää koeolosuhteita. Liuossäilyvyyttä tutkittaessa näytteitä säilytettiin säilöpulloissa, jotka temperoitiin huoneenlämpöön ennen mittausta. On mahdollista, että säilöpullöjen seinämät ovat temperoinnista huolimatta kylmentäneet liuosta. Lämpötilan vaikutusta mittauksiin pyrittiin minimoimaan suorittamalla mittaukset lämpötilahallitussa laboratoriotilassa. Astian kylmentävää vaikutusta näytteen lämpötilaan ja siten mittaustulokseen ei voida kuitenkaan poissulkea täysin. Jos tutkimus toteutettaisiin uudelleen, temperointikäytänteisiin voisi kiinnittää enemmän huomiota.

## Lähteet

- 1 Hemoglobiini on punasoluissa oleva rautapitoinen proteiini, joka kuljettaa happea keuhkoista kudoksiin. Verkkoaineisto. Suomen Terveystalo Oy. <<https://www.terveystalo.com/fi/tietopakettit/hemoglobiini-b-hb/>> Luettu 30.5.2022.
- 2 What is the Function of Hemoglobin in the Human Body. Verkkoaineisto. Pediaa.com. <<https://pediaa.com/what-is-the-function-of-hemoglobin-in-the-human-body/>> Luettu 30.5.2022.
- 3 Tunturi, Satu. 2022. Hemoglobiini (B-Hb). Verkkoaineisto. Duodecim terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk03031/hemoglobiini-b-hb>> 23.2.2022. Luettu 6.6.2022
- 4 Jalanko, Hannu. 2021. Anemia lapsella. Verkkoaineisto. Duodecim terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00110/anemia-lapsella>> 18.2.2021. Luettu 6.6.2022.
- 5 QuikRead go iFOBT. Verkkoaineisto. Aidian. <<https://www.aidian.fi/vieritestausta/quikread-go/quikread-go-ifobt#ulosteen-piilevan-veren-testaus-ja-paksusuolen-syopa>> Luettu 17.6.2022.
- 6 Yetman, Daniel. Saurabh, Sethi. 2022. Kuvitus Mulcare Yaja. Colon Polyp Sizes and Types. Verkkoaineisto. Healthline Networks (Healthline Media) - <<https://www.healthline.com/health/colorectal-cancer/colon-polyp-size-chart>> Luettu 17.6.2022.
- 7 Metalloproteins. Verkkoaineisto. Nature Publishing Group. <<https://www.nature.com/subjects/metalloproteins>> Luettu 30.5.2022.
- 8 Hoffbrand, A. Victor & Moss A. H. Paul. 2015. Hoffbrand's Essential Haematology. 7th edition. E-kirja. Ebook Central.
- 9 Hemoglobiini. Verkkoaineisto. Solunetti. Opetushallitus. <<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hemoglobiini/2/>> Luettu 30.5.2022.
- 10 Williams Patricia. 2004. Max Perutz, a Nobel Prize winner, and Alain Marengo Rowe. Verkkoaineisto. PubMedCentral. National Library of Medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200715/>> Luettu 30.5.2022.

- 11 Wikström, Mårten. 1993. Happi – solujen välttämätön ravinto. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. 23/1993. Luettu 15.10.2022.
- 12 Umbreit, Jay, 2007. Methemoglobin – It's Not Just Blue: A Concise Review. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16986127/>> Luettu 29.6.2022.
- 13 Dyshemoglobin. 2009. Verkkoaineisto. The Free Dictionary by Farlex. <<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/dyshemoglobin>> Luettu 20.6.2022.
- 14 Goldman, Lee & Schafer, Andrew. 2020. Goldman-Cecil Medicine. 26th edition. Approach to the Anemias -luku.
- 15 Structures of Hemoglobin forms. Verkkoaineisto <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Structures\\_of\\_Hemoglobin\\_forms.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Structures_of_Hemoglobin_forms.png)> Luettu 16.6.2022.
- 16 Transport of Gases. Verkkoaineisto. Vendatu. <<https://www.vedantu.com/question-answer/haemoglobin-shows-maximum-affinity-with-a-carbon-class-11-biology-cbse-5f5c8d0068d6b37d160f716a>> Luettu 20.6.2022.
- 17 Palmeri, Renata. Gupta, Vikas. Carboxyhemoglobin Toxicity. Verkkoaineisto. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557888/>> Päivitetty 21.4.2022. Luettu 20.6.2022.
- 18 Keohane, Elaine M; Otto, Catherine N; Walenga Jeanine M. 2020. Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications. <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/sulphemoglobin>> Luettu 21.6.2022.
- 19 Syanoosi. 2016. Verkkoaineisto. Lääketieteen sanasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03322>> Luettu 21.6.2022.
- 20 Bhomia, R; Trivedi, V; Coleman, NJ & Mitchell, JC. 2016. The thermal and storage stability of bovine haemoglobin by ultraviolet-visible and circular dichroism spectroscopies. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5762605>> Luettu 1.7.2022.
- 21 Huang, Yao-Xiong; Wu, Zheng-Jie; Huang, Bao-Tian & Luo, Man. 2013. Pathway and mechanism of pH dependent human hemoglobin tetramer-dimer-monomer dissociations. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842943/>> Luettu 29.6.2022.

- 22 Weiler, Julia. 2018. The many structures of the light-active biomolecules. EPR Spectroscopy Working Group. Faculty of Chemistry and Biochemistry. Ruhr-Universität Bochum.  
<<https://news.rub.de/english/press-releases/2018-10-09-chemistry-many-structures-light-active-biomolecules>> Luettu 22.10.2022.
- 23 Fallon, Aidan. 2012. Laser Light interaction with Haemoglobin Molecule and Spectroscopic Techniques used to determine its concentrations. Thesis for Bachelor of Sciences, Physics with Biomedical Sciences. Dublin City University. ResearchGate.
- 24 Okada Ayako, Nomura Yoshiaki, Sogabe Kaoru, Oku Hirofumi, Gillbreath Arika Sato, Hino Fumiko, Hayashi Hideo, Yoshino Hirokazu, Utsunomiya Hisanori, Suzuki Kazuyuki, Koresawa Keizo, Koba Kenji, Uetani Kimiyuki, Kotoh Mami, Nishitsuji Naoyuki, Akutsu Satoshi, Nakasone Takakazu, Tobi Yasushi, Fukuzawa Yoichi, Yabuki Yoshihide, Naono Yoshinobu, Yajima Masataka, Shimizu Keita, Hanada Nobuhiro. 2017. Comparison of salivary hemoglobin measurements for periodontitis screening. Volume 59 Issue 1.
- 25 Schifman RB, Luevano DR. 2019. Value and Use of Urinalysis for Myoglobinuria. Arch Pathol Lab Med.
- 26 Point-of-Care Testing vs. Laboratory Testing. Verkkoaineisto. Truvian Sciences. <<https://truvianhealth.com/blog/point-of-care-testing-vs-laboratory-testing/>> 18.11.2020 Luettu 8.6.2022.
- 27 Sneck, Mia; Kiiskinen, Salla; Hotakainen, Kristiina; Krum, Kirsi; Herrala, Annakaisa; Paattiniemi, Eeva-Liisa; Burakoff, Päivi; Berghäll, Heidi. 2021. Verkkoaineisto. <<https://www.labquality.fi/vieritestisuositus/>> Luettu 8.6.2022.
- 28 Vierianalytiikka – POC. Verkkoaineisto. Roche Oy. <<https://www.roche.fi/fi/diagnostiikka/laboratoriot-terv-ammattilaiset/vierianalytiikka.html>> Luettu 8.6.2022.
- 29 Van Kampen, E.J & Zijlstra, W.G. Advances in Clinical Chemistry. Spectrophotometry of Hemoglobin and Hemoglobin derivatives. Vol. 23. s.200-201
- 30 Suzaki, Hinori; Kobayashi, Naoki; Nagaoka, Takahsi; Iwasaki, Kiyotaka; Umezu, Mitsuo; Takeda, Sunao; Togawa, Tatsuo. 2006. Noninvasive measurement of total hemoglobin and hemoglobin derivatives using multiwavelength pulse spectrophotometry -In vitro study with a mock circulatory system. EMBS Annual International Conference.

- 31 Meng, Fantao; Alayash, Abdu. 2017. Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5303181>> Luettu 1.7.2022
- 32 DiaSys Immunoturbidimetric Tests No Doubt. Markkinointimateriaali. DiaSys Diagnostic Systems GmbH. <[https://www.diasys-diagnostics.com/fileadmin/promo-toolbox/Flyers\\_in\\_English/820023\\_Flyer\\_Immunoturbidimetry/ENG\\_Broschuere\\_Immunoturbidimetry\\_A4\\_150327\\_ANSICHT.pdf?\\_=1429518189](https://www.diasys-diagnostics.com/fileadmin/promo-toolbox/Flyers_in_English/820023_Flyer_Immunoturbidimetry/ENG_Broschuere_Immunoturbidimetry_A4_150327_ANSICHT.pdf?_=1429518189)> Luettu 14.6.2022.
- 33 NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-ONE-W>>
- 34 A custom method for hemoglobin measurements Using the NanoDrop One Spectrophotometer. Tuotedokumentti. Thermo Fisher Scientific.
- 35 QuikRead go. Verkkoaineisto. Aidian. <<https://www.aidian.fi/vieritestaas/quikread-go/quikread-go-instrument>> Luettu 27.6.2022.
- 36 T-TEST: TWO-SAMPLE ASSUMING EQUAL VARIANCES. Verkkoaineisto. FrontlineSolvers. <<https://www.solver.com/t-test-two-sample-assuming-equal-variances-0>> Luettu 12.10.2022.
- 37 Hemoglobin human. Verkkoaineisto. Merck. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/product/sigma/h7379>> Luettu 17.8.2022

## Liuosäilyvyyssnäytteiden Nanodrop-absorbanssien t-testitulokset

Taulukko 1. Met 4 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
4	0,98	0,15	0,14	0,05
22	0,38	0,26	0,19	0,04
28	0,10	0,01	-	-
46	0,30	0,24	0,16	0,03
70	0,47	0,28	0,06	0,06
142	0,91	0,51	0,20	0,07
190	-	-	0,40	0,37
238	-	-	0,85	0,89
334	0,74	0,43	0,39	0,53
478	-	-	0,70	0,80

Taulukko 2. Oxy 4 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
4	0,47	0,15	0,10	0,04
22	0,79	0,33	0,02	0,08
28	0,00	0,00	-	-
46	0,08	0,12	0,02	0,03
70	0,41	0,69	0,27	0,03
142	0,01	0,60	0,85	0,42
190	-	-	0,10	0,69
238	-	-	0,31	0,28
334	0,14	0,91	0,50	0,02
478	-	-	0,07	0,93

Taulukko 3. Stock -näytteiden t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	MET STOCK L-K-P	OXY STOCK L-HL-P	OXY STOCK L-K-P
4	0,02	0,01	0,01
22	0,00	0,01	0,00
28	0,00	0,00	-
46	0,00	0,00	0,04
70	0,00	0,01	0,00
142	0,25	0,00	0,01
190	0,27	-	0,06
238	-	-	0,13
334	0,04	0,00	0,02
478	0,19	-	0,56

Taulukko 4. Oxy Stock L-HL-P, vertailunäytteenä 4 tunnin aikapiste, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	L-HL-P
4	1,00
22	0,96
28	0,06
46	0,01
70	0,47
142	0,00
334	0,00

## Liuosäilyvyysnäytteiden Nanodrop-spektrien maksimiabsorbanssit

Taulukko 1. Met 4 -näytteen maksimiabsorbanssit.

Aika (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
0	417,5	417,5	417,5	417,5
4	417	417	417	417
22	418,5	418,5	417	418
46	417	417,5	418	417,5
70	418	418	417,5	417,5
142	418	418	418	417,5
190	418	417,5	418	417
238	417,5	418	418	417,5
334	-	-	417	417,5
478	-	-	417	417
ka	417,6875	417,75	417,5	417,4

Taulukko 2. Oxy 4 -näytteen maksimiabsorbanssit.

Aika (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
0	417,5	417,5	417,5	417,5
4	417	417	417	417
22	418,5	418,5	417	418
46	417	417,5	418	417,5
70	418	418	417,5	417,5
142	418	418	418	417,5
190	418	417,5	418	417
238	417,5	418	418	417,5
334	-	-	417	417,5
478	-	-	417	417
ka	417,6875	417,75	417,5	417,4

## Liuosäilyvyyssnäytteiden QuikRead go-absorbanssimuutosten t-testitulokset

Taulukko 1. Met 1 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
4	0,23	0,30	0,32	0,19
22	0,47	0,07	0,26	0,04
28	0,01	0,16	-	-
46	0,00	0,89	0,24	0,09
70	0,00	0,88	0,01	0,03
142	0,00	0,22	0,06	0,00
190	-	-	0,00	0,00
238	-	-	0,79	0,01
334	0,00	0,00	0,03	0,00
478	-	-	0,00	0,01

Taulukko 2. Oxy 1 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
4	0,73	0,56	0,05	0,35
22	0,03	0,32	0,44	0,79
28	0,02	0,05	-	-
46	0,02	0,03	0,89	0,53
70	0,12	0,00	0,42	0,13
142	0,00	0,01	0,79	0,13
190	-	-	0,04	0,00
238	-	-	0,01	0,09
334	0,00	0,00	0,06	0,03
478	-	-	0,03	0,01

Taulukko 3. Met 2 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
4	0,24	0,06	0,03	0,14
22	0,02	0,03	0,06	0,13
28	0,00	0,00	-	-
46	0,00	0,00	0,26	0,04
70	0,00	0,00	0,02	0,00
142	0,00	0,00	0,01	0,00
190	-	-	0,01	0,00
238	-	-	0,05	0,00
334	0,00	0,00	0,00	0,00
478	-	-	0,00	0,00

Taulukko 4. Oxy 2 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	L-HL-P	L-HL-V	L-K-P	L-K-V
4	0,01	0,00	0,52	0,06
22	0,42	0,00	0,09	0,04
28	0,12	0,07	-	-
46	0,34	0,36	0,00	0,16
70	0,00	0,61	0,06	0,00
142	0,34	0,70	0,01	0,00
190	-	-	0,49	0,03
238	-	-	0,05	0,00
334	0,01	0,00	0,26	0,68
478	-	-	0,59	0,35

## Pakastesäilyvyysnäytteiden Nanodrop-absorbanssien t-testitulokset

Taulukko 1. Met 4 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
4	0,05	0,91	-	-
8	0,21	0,89	0,59	0,22
24	0,01	0,00	0,02	0,00
48	0,03	0,16	0,32	0,06
72	0,16	0,62	0,32	0,33
144	0,15	0,71	0,56	0,60
192	-	-	0,48	0,45
240	-	-	0,07	0,86
312	-	-	0,74	0,01
480	-	-	0,10	0,59

Taulukko 2. Oxy 4 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

mittauspiste (h)	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
4	0,24	0,02	-	-
8	0,80	0,40	0,29	0,96
24	0,00	0,00	0,00	0,00
48	0,25	0,03	0,01	0,01
72	0,47	0,28	0,69	0,80
144	0,57	0,58	0,69	0,05
192	-	-	0,90	0,21
240	-	-	0,18	0,65
312	-	-	0,38	0,08
480	-	-	0,89	0,55

## Pakastesäilyvyysnäytteiden Nanodrop-spektrien maksimiabsorbanssit

Taulukko 1. Met 4 -näytteen maksimiabsorbanssiaallonpituudet.

h	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
0	417.5	417.5	417.5	417.5
8	417	417	417	416.5
24	417	418	417.5	417.5
48	417	417	417	417
72	417	417.5	417	417
144	417	417.5	417.5	417.5
192	-	-	417.5	417.5
240	-	-	417.5	417.5
312	-	-	418	417.5
480	-	-	417.5	417.5
ka	417.0833333	417.4167	417.4	417.3

Taulukko 2. Oxy 4 -näytteen maksimiabsorbanssiaallonpituudet.

h	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
0	418	417,5	418	417,5
8	417,5	417,5	417,5	417,5
24	417,5	417,5	417,5	417,5
48	417,5	417,5	417	417,5
72	417,5	417,5	417,5	417
144	418	417,5	417,5	417,5
192	-	-	417,5	418
240	-	-	418	417,5
312	-	-	418	418
480	-	-	418	417,5
ka	417,666667	417,5	417,65	417,55

## Pakastesäilyvyysnäytteiden QuikRead go- absorbanssimuutosten t-testitulokset

Taulukko 1. Met 1 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

Aikapiste (h)	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
4	0,45	0,54	-	-
8	0,46	0,41	0,88	0,44
24	0,04	0,06	0,73	0,35
48	0,00	0,00	0,04	0,11
72	0,02	0,00	0,02	0,34
144	0,04	0,02	0,46	0,42
192	-	-	0,05	0,16
240	-	-	0,02	0,04
312	-	-	0,01	0,02
480	-	-	0,00	0,01

Taulukko 2. Oxy 1 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

Mittauspiste (h)	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
4	0,13	0,09	-	-
8	0,01	0,05	0,10	0,36
24	0,01	0,00	0,00	0,18
48	0,01	0,00	0,04	0,05
72	0,00	0,00	0,18	0,04
144	0,00	0,00	0,04	0,18
192	-	-	0,02	0,02
240	-	-	0,00	0,00
312	-	-	0,00	0,00
480	-	-	0,00	0,00

Taulukko 3. Met 2 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %

Mittauspiste (h)	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
4	0,08	0,01	-	-
8	0,55	0,02	0,29	0,15
24	0,00	0,00	0,76	0,03
48	0,00	0,00	0,05	0,09
72	0,00	0,00	0,47	0,02
144	0,00	0,00	0,28	0,00
192	-	-	0,00	0,00
240	-	-	0,00	0,00
312	-	-	0,00	0,00
480	-	-	0,00	0,00

Taulukko 4. Oxy 2 -näytteen t-testitulokset, luottamustaso 95 %.

Mittauspiste (h)	A-HL-P	A-HL-V	A-K-P	A-K-V
4	0,15	0,04	-	-
8	0,21	0,01	0,51	0,00
24	0,03	0,00	0,06	0,03
48	0,10	0,00	0,07	0,00
72	0,01	0,00	0,38	0,11
144	0,00	0,00	0,47	0,82
192	-	-	0,44	0,00
240	-	-	0,02	0,00
312	-	-	0,02	0,00
480	-	-	0,03	0,00