

Merituulia Moilanen

PINP- ja PIIINP-VIITEARVOPROJEKTI

Viitearvojen määrittäminen kollageenimerkkiaineille

PINP- ja PIIINP-VIITEARVOPROJEKTI

Viitearvojen määrittäminen kollageenimerkkiaineille

Merituulia Moilanen
Opinnäytetyö
Syksy 2015
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä: Merituulia Moilanen

Opinnäytetyön nimi: PINP- ja PIIINP viitearvoprojekti: Viitearvojen määrittäminen kollageenimerkkiaineille

Työn ohjaaja: Marja-Kaisa Koivula ja Paula Reponen

Työn valmistusluku- ja vuosi: Syksy 2015

Sivumäärä: 35 + 37 liitesivua

Tyypin I prokollageenin aminoterminaalinen propeptidi seerumista (S-PINP) on herkkä kuvaamaan tyypin I kollageenin metaboliaa elimistössä. S-PINP kuvastaa luukudoksen synteesiä ja sitä mittaamalla voidaan myös seurata syövän etäpesäkkeiden leviämistä luustossa sekä arvioida osteoporoosihoidon tehoa. Tyypin III prokollageenin aminoterminaalista propeptidiä (S-PIIINP) esiintyy pehmytkudoksissa ja sen määrä on suurentunut esimerkiksi fibroosia aiheuttavissa sairauksissa. S-PINP ja S-PIIINP eivät ole spesifisiä millekään sairaudelle, mutta niiden mittaaminen voi antaa lääkärille tarkempaa tietoa potilaan terveydellisestä tilasta ja hoidon onnistumisesta.

S-PINP on validoitu laboratoriotutkimus NordLabissa ja se määritetään rutiinimenetelmänä erityisanalytiikan laboratoriossa automaattisella IDS-iSYS-immunoanalysaattorilla. S-PINP-tutkimukselle on aiemmin käytetty belgialaisesta aineistosta laadittuja viitearvoja. Keväällä 2014 S-PIIINP:n määrittämiseen on validoitu uusi menetelmä automaattiselle Siemens ADVIA Centaur-immunoanalysaattorille ja uusi menetelmä on korvannut aiemman radiologisia merkkiaineita käyttävän menetelmän. Uudelle menetelmälle ei ole vielä olemassa viitearvoja.

Tilauksena toteutetun viitearvoprojektin tarkoituksena on määrittää uudet S-PINP- ja S-PIIINP-viitevälit suomalaiselle väestölle iän ja sukupuolen mukaisesti. Projekti on osa laboratorion omaa menetelmäkehitystyötä ja se noudattaa kansainvälisiä viitevälisuosituksia. Tavoitteena on laatia molemmille tutkimuksille viitevälit tilastomatemattisia malleja käyttämällä. Tutkimusaineistona käytetään kevään 2014 aikana kerättyjä erityisanalytiikan laboratorion, lasten laboratorion ja päivystylaboratorion ylijäämänäytteitä. Kerätyille potilasnäytteille on laadittu tarkat poissulkukriteerit yhteistyössä erikoislääkärin kanssa. Tutkimukseen soveltuvan viiteaineiston valinnassa käytetään apuna Oulun Yliopistollisen Sairaalan ESKO-potilastietojärjestelmää.

Asiasanat: S-PINP, S-PIIINP, kollageeni, viitearvot, viitevälit, projekti

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Author: Merituulia Moilanen

Title of thesis: Reference interval project for collagen biomarkers PINP and PIIINP

Supervisors: Marja-Kaisa Koivula and Paula Reponen

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2015 Number of pages: 35 + 37 appendix pages

The amino-terminal propeptide of type I procollagen in serum (S-PINP) is a sensitive indicator of type I collagen metabolism in human body. Specifically S-PINP depicts bone tissue synthesis. A measurement of S-PINP helps physicians to follow up spreading tumours with metastases or it can be used for monitoring osteoporosis therapy. Type III collagen can be found in soft tissues. Quantity of amino-terminal propeptide of type III procollagen (S-PIIINP) in serum increases in case of fibrotic diseases or in similar conditions. S-PINP and S-PIIINP are not specific for any certain disease but measurement of those biomarkers can give a physician important information about patients' health status and effectivity of a treatment.

S-PINP is a validated laboratory assay in NordLab and it is measured as a routine practice by an automatic IDS-iSYS-immunoanalyzer. In spring 2014 a new analysis method was validated for Siemens ADVIA Centaur S-PIIINP assay. The new method has been introduced as a replacement of a previous radioimmunoassay. There are no reference ranges for the new S-PIIINP method.

The reference range project is based on an assignment for NordLab laboratories and aim of the study is to define reference intervals by age and sex, available for Finnish population and S-PINP and S-PIIINP assays. The project is a part of laboratorys own method development and it follows international referenge interval guidelines for clinical laboratories. The new reference intervals are calculated by using applications of mathematical statistics. The reference population is based on surplus serum samples collected from special chemistry laboratory, laboratory for children and service laboratory in NordLab. Exclusion criteria for the reference population is formed considering scientific research and set by specialist doctor. A patient information system ESKO used in Oulu University Hospital is utilized for applying patient health data and selecting suitable reference population for this study.

Keywords: S-PINP, S-PIIINP, collagen, reference range, reference intervals, project

SISÄLLYS

1	TUTKIMUSPROJEKTIN KUVAUS JA TAVOITTEET	6
2	VIITEARVOT	8
2.1	Viitearvofilosofia	8
2.2	Viitearvojen määrittäminen	9
2.3	Viiterajojen laskemiseen käytettävät menetelmät	10
3	KOLLAGEENIT	12
3.1	Kollageenien metabolia	12
3.2	Tyyppin I prokollageenin aminoterminaalinen propeptidi	13
3.3	Tyyppin III prokollageenin aminoterminaalinen propeptidi	15
3.4	Kollageenimerkkiaineiden mittausmenetelmät	16
4	TUTKIMUSPROSESSIN KUVAUS	19
4.1	Viitearvoprojektin suunnittelu, aikataulu ja työnjako	19
4.2	Näytekeräys ja aineiston valinta	20
4.3	Näytteiden analysointi immunoanalysaattoreilla	21
4.4	Tilastollinen analyysi	22
5	UUDET VIITEVÄLIT JA TULOSTEN KUVAAJAT	25
6	POHDINTA	29
	LÄHTEET	31
	LIITTEET	36

1 TUTKIMUSPROJEKTIN KUVAUS JA TAVOITTEET

Viitearvoprojektin tarkoituksena oli luoda NordLabin käyttöön uudet viitearvot tyyppin I ja III prokolageenin aminoterminaaliseen propeptidille. Seerumista mitattavat PINP ja PIIINP ovat kollageenimerkkiaineita, jotka kuvastavat luun metaboliaa ja pehmytkudosten fibroosia monissa sairauksissa. Kevään 2014 aikana NordLabissa validoitiin automaattinen kemiluminesenssiin perustuva analyysimenetelmä Siemens ADVIA Centaur-immunoanalysaattorille PIIINP-määritykseen vanhan radioimmunologisen määrityksen tilalle. PINP-määritykseen käytetään validoituna rutinimenetelmänä IDS-iSYS-immunoanalysaattoria.

Tavoitteena oli viitevälien määrittäminen PINP- ja PIIINP-mittausmenetelmille iän ja sukupuolen mukaisesti. Kollageenimerkkiaineiden uudet viitearvot suomalaiselle väestölle olivat toivottuja, sillä aiemmin NordLabin laboratoriossa S-PINP:n viitearvoina on käytetty belgialaisesta aineistosta laadittuja viitearvoja. Uudelle automaattiselle Siemens ADVIA Centaurin S-PIIINP-menetelmälle ei vielä ollut käytettävissä minkäänlaisia viitearvoja.

Viitearvot määritettiin lasten-, erityisanalytiikan ja päivystyslaboratorion ylijäämänäytteistä, jotka kerättiin ja kirjattiin vuoden 2014 helmi-kesäkuun aikana. Anonyymeiksi koodatuille ylijäämänäytteille ei tarvinnut hakea erikseen eettisen toimikunnan kudostutkimuslupaa, koska projekti oli myös osa laboratorion omaa menetelmäkehitys- ja tutkimustyötä. Potilasnäytteille oli asetettu tarkasti määritellyt poissulkukriteerit, jotka perustettiin tieteellisiin artikkeleihin. Luunmurtuma kuluneen vuoden aikana, mikä tahansa diagnostinen luusto-, kardiovaskulaarinen, gastrointestinaalinen tai endokrinologinen sairaus, maksan, munuaisten tai keuhkojen toimintaan vaikuttava sairaus, kasvuhäiriö sekä mikä tahansa syöpä olivat viiteaineistonäytteiden poissulkukriteerejä. Myös henkilöt, joilla oli käytössä kollageenimetaboliaan vaikuttavia lääkkeitä, jätettiin pois viiteaineistosta. Viitearvotutkimukseen osallistuvan henkilön tiedot sekä terveydentila tarkastettiin OYS:n ESKO-potilastietojärjestelmästä. Ylijäämänäytteitä kerättiin lähes 1000 kappaletta, ja näistä valittiin 365 kappaletta viiteaineistoksi.

Kerätyt näytteet analysoitiin automaattisilla IDS-iSYS- ja Siemens ADVIA Centaur -analysaattoreilla yhdessä ohjaavan ja laitteistoon perehtyneen laboratoriohenkilökunnan kanssa. Saadut laboratoriotulokset analysoitiin tilastollisesti Excel-ohjelmaa käyttäen. Tietosuojasta ja henkilöiden anonymiteetista huolehdittiin tarkasti tietosuojalain mukaisesti koko projektin ajan.

Viitearvoprojekti toimi moniammatillisesti yhdistäen eri alojen osaajat ja ammattitaidon. Viitearvoprojektista vastasi ja sitä ohjasi NordLabin sairaalakemisti Marja-Kaisa Koivula, jolla on myös aikaisempaa kokemusta viitearvojen ja viitevälien määrittämisestä. Projektin lääketieteellisinä vastuuhenkilöinä toimivat professori Juha Risteli ja ylilääkäri Leila Risteli. Viitearvoprojektissa toimineiden ammattilaisten tutkimusryhmä on ollut mukana monessa kollageenitutkimuksessa vuosikymmenten ajan sekä on kansainvälisestikin tunnettu ja arvostettu. Oma osuuteni projektissa oli viiteaineiston näytteiden keräys ja näytekeräyksen organisointi. Lääketieteen kandidaatti Jenni Mattila oli vastuussa tutkimusaineiston valinnasta. Tilastollisen aineiston käsittelyn tein yhteistyössä Koivulan ja Mattilan kanssa. Opinnäytetyöhöni sain ohjausta lehtori Paula Reposelta ja lehtori Elisa Laukkaselta. Projektin pohjalta syntyy myös tieteellinen artikkeli kansainväliseen julkaisuun ja lääketieteen syventävien opintojen opinnäytetyö.

Kansainväliset viitevälisuositukset ohjaavat kliinisiä laboratorioita tuottamaan laboratoriotutkimuksille laadukkaita ja vertailukelpoisia tuloksia. Sen lisäksi laboratorion omat menetelmäkohtaiset viitearvot ovat merkityksellisiä laboratoriotutkimustulosten kliinisessä tulkinnassa. Laboratorion toiminnan kehittämisen ja laadun ylläpitämisen kannalta viitearvoprojekti oli siten tarpeellinen ja hyvin ajankohtainen. Viitearvoprojektin henkilökohtaisina tavoitteina minulla oli oman ammatillisen osaamisen soveltaminen uuteen projektiluontoiseen työhön sekä oppimisen syventäminen käytännön laboratoriotyön ja tilastomenetelmien kautta. Tavoittelin perusteellisempaa ymmärrystä viitearvojen luomisesta ja tietoa siihen kuuluvista prosesseista.

2 VIITEARVOT

Lääkärin tekemä tulkinta henkilön terveydentilasta pohjautuu usein informaatioon laboratoriotuloksista. Viitearvoja voidaan pitää tietynlaisina apuvälineinä tehtyjen lääketieteellisten havaintojen tulkinnassa. (Linko, Ahonen, Eirola & Ojala 2000, 163–164.) Viitearvolla tarkoitetaan tilastollista suuretta, joka erottelee terveet sairaista ja viitevälillä muodostuu laskettujen tulosten alueesta, jossa terveiden henkilöiden arvot yleensä ovat. (Penttilä 2004, 18). Viitearvot ja viiterajat ovat tutkimus- ja potilaskohtaisia vertailulukuja, ja perustuvat oletetun terveen ja sairaan henkilön tuloksiin, joten laboratoriotutkimuksen mittaustuloksia tulisi tulkita vain verraten arvoja sopiviin verrokkiarvoihin. (Linko ym. 2000, 159). Kansainvälisen standardin (CLSI ja IFCC 2008) mukainen viitearvoterminologia kuuluu lyhyesti määriteltynä: ”Viiteyksilöt muodostavat viiteväestön, josta voidaan valita viiteotos, josta määritetään viitearvot, joilla todetaan viitejakauma, joista lasketaan viiterajat, jotka rajaavat viitevälin.” (Kairisto 2010, 35–36.)

2.1 Viitearvofilosofia

Viitearvokäsitteen luojaan Ralph Gräsbeckin mukaan ajatusmallia viitearvoista voidaan pohjimmiltaan pitää filosofisena. Vuonna 1969 kliinisen laboratoriolääketieteen konferenssissa Gräsbeck ja Nils-Erik Saris toivat käsitteen ”normaaliarvo” tilalle uuden määritelmän, sillä ”normaali” oli käsitteenä tieteellisesti virheellinen ja monitulkintainen. (Gräsbeck 2004, 692, viitattu 10.2.2015) Kliinisen lääketieteen yhteydessä normaalius yleisesti assosioidaan terveyteen ja ei-patologiseen tilaan. Käsitteet normaaliudesta kuitenkin vaihtelevat ja esimerkiksi tilastollinen normaalius tarkoittaa usein ja yleisesti esiintyvää ilmiötä, kun taas epänormaalina pidetään ilmiötä, joka havaitaan harvakseltaan. (Kauhanen, Myllykangas, Salonen & Nissinen 1998, 82–83.) Uutena terminä viitearvo sen sijaan antoi ymmärtää, että verrokkiarvoja olisi käytettävissä tuloksen tulkinnan apuna (Kairisto 2010, 35). Viitearvokäsitteen mukana on tullut myös pohdittavaksi se, mikä yleisesti käsitetään terveytenä. Biolääketieteellisen mallin mukaan terveys voidaan määritellä kliinisten oireiden ja löydösten puuttumisena. Terveys on kuitenkin käsitteenä suhteellista ja osaksi myös kulttuurisidonnaista, joten usein tarkkaa rajaa terveen ja sairaan välille on vaikea vetää. (Kauhanen, Erkkilä, Korhonen, Myllykangas & Pekkanen 2013, 101–102.) Viitearvotutkimuksissa

verrokkihenkilöiden terveydentilan määrittely onkin viitearvojen luomisen haastavimpia kysymyksiä.

Viitearvoja pyritään tuottamaan monille eri laboratoriotutkimuksille ja viitevälit voidaan laskea myös sairaiden viitehenkilöiden otoksista, joten jokaisen eri tutkimuksen kohdalla verrokkien valinnassa tulee käyttää laajaa asiantuntemusta tuloksiin mahdollisesti vaikuttavista tekijöistä. Useita viiteryhmiä käyttämällä laboratoriotulosten käyttöarvo paranee ja niiden tulkinta on tarkempaa. Verrokkihenkilöiden tulisi muistuttaa mahdollisimman tarkasti potilasta itseään esimerkiksi iän, sukupuolen, rodun, fyysisen ja psyykkisen terveydentilan mukaan. Mahdollinen ero laboratoriotuloksessa potilaan ja verrokin välillä johtuu tällöin todennäköisemmin sairaudesta eikä muista tekijöistä. (Kairisto 2010, 35–36.)

2.2 Viitearvojen määrittäminen

Terveydenhuoltolaki ohjaa erikoissairaanhoidollisia palveluja ja näin myös laboratoriodien palveluiden kehittäminen ja laadunvalvonta sekä tutkimustoiminta ovat laissa säädettäviä toimintoja (Perusterveydenhuollon ja erikoissairaanhoidon yhteistyö 1326/2010 §33). Viime vuosikymmeninä laboratoriotutkimusten määrä ja uusien merkkiaineiden löytyminen sekä niiden merkitys diagnostiikassa on kasvanut. Kehittyvät laitteet ja menetelmät lisäävät tarvetta uusille viitearvoille, kuten myös väestön elinolosuhteiden muutokset. EU:ssa käytössä olevat direktiivit velvoittavat analyysilaitteiden valmistajia huolehtimaan viiterajojen tuottamisesta ja tulostasosta referenssimenetelmän avulla. Referenssimenetelmän käytöllä varmistetaan, että tutkittavalle analytyille saadaan mahdollisimman oikea tulos, joka on spesifinen mitatulle aineelle. Laboratoriot ovat kuitenkin itse vastuussa viiterajojen soveltuvuudesta paikalliselle väestölle. Viiterajojen soveltuvuus tulee varmistaa viiteotoksella, johon yleensä riittää parikymmentä viitearvonäytettä. (Kairisto 2010, 36, 50.) Kliinisissä laboratorioissa arvostetaan jatkuvaa menetelmäkehitystyötä, mutta viitearvojen määrittäminen koetaan usein pitkäksi ja hankalaksi prosessiksi, joka vaatii asiaan perehtymistä, tutkimuksen suunnittelua ja ylimääräisiä resursseja (Aytikin & Emerk 2008, 2–4, viitattu 18.9.2015).

Erityisanalytiikkaan verrattuna perustason klinisen kemian laboratorioissa analytiikka on hyvin standardisoitua ja tuloksia voidaan vertailla referenssimenetelmiin. Erityisanalytiikan, kuten

esimerkiksi hormonimääritysten, haasteena ovat suuret erot analyttisissä tulostasoiissa laboratorioden välillä, minkä vuoksi laboratorion ilmoittamat omat viiterajat omille menetelmille ovat tärkeitä tulosten tulkinnassa. (Kairisto 2010, 37.) Laaja pohjoismainen viiteväliprojekti NORIP (Nordic Reference Interval Project) toimi vuosina 1999–2004 ja hankkeen avulla kerättiin viitearvomäärittämiseen noin 3000 viitehenkilön näytteitä noin sadalta eri laboratoriolta. Projektin tarkoituksena oli määrittää 25:lle kliinisen kemian tutkimukselle yhtenäiset Pohjoismaissa käytettävät viitevälit, jolloin myös yhteisten päätösrajojen luominen voisi helpottua. Analyysin tuottajille kansainvälisten tulostasojen yhtenäistäminen tuo etuja ja tuloksia on helpompi vertailla laboratorioden kesken, mutta tämän kokoluokan viitearvoprojektit ovat hyvin vaativia. Haasteita niiden toteuttamiseen tuovat osallistujien rekrytointi, projektin rahoitus ja tutkimuksen pitkäkestoisuus. (Felding, Franzson, Kairisto, Petersen, Rustad & Simonsson, viitattu 17.10.2015; Ihalainen 2012, 116–119.)

2.3 Viiterajojen laskemiseen käytettävät menetelmät

Normaalijakauma eli Gaussin symmetrinen jakauma on todennäköisyyslaskennan ja tilastotieteen yksi käytetyimmistä jatkuvista jakaumista. Symmetristä jakaumaa voidaan esittää graafisesti, jolloin havaitaan jakauman yksihuippuisuus keskiarvon kohdalla sekä keskihajonnan määrittämä jakauman muoto. (Sarpola, viitattu 15.10.2015.) Biologiset muuttujat, kuten esimerkiksi syntymäpaino tai veren hemoglobiinipitoisuus, jakautuvat väestössä usein Gaussin käyrän mukaisesti. Joidenkin laboratoriotutkimustulosten viitejakaumat eivät aina noudata suoraan Gaussin käyrän periaatetta. Epäsymmetriset jakaumat voivat olla negatiivisesti tai positiivisesti vinoja riippuen laboratoriotutkimuksista. (Penttilä 2004, 19.) Viiterajojen määrittämiseen on kehitetty soveltavia transformaatiomenetelmiä, joiden avulla epäsymmetrinen viitejakauma on mahdollista muuttaa muodoltaan symmetrisen jakauman kaltaiseksi (Kairisto 2003, 26).

Symmetrisestä jakaumasta viiterajat määritetään laskemalla keskiarvo ja lisätään sekä vähennetään siitä kaksi vakiopoikkeamaa ($\text{keskiarvo} \pm 2 \times \text{SD}$). Viiterajat osuvat silloin noin -2:n ja +2:n keskihajonnan rajojen kohdalle. 2,5 %:n ja 97,5 %:n rajat ovat yleisesti käytettyjä viitejakauman rajoja, ellei toisenlaisia prosenttirajoja ole erikseen ilmoitettu. (Kairisto 2010, 36; Penttilä 2004, 26–27.) Kun viitejakauma on vino eli epäsymmetrinen, käytetään viiterajojen laskemiseksi transformaatiomenetelmiä, kuten alkuperäisten viitearvojen korotusta määriteltyn

potenssiin tai logaritmin ottoa alkuperäisistä arvoista. Viiterajat voidaan myös määrittää epäparametrisella menetelmällä, joka on riippumaton viitejakauman muodosta, mutta vaatii tarpeeksi suuren viiteotoksen. Epäparametrisessa menetelmässä viitearvot asetetaan suuruusjärjestykseen ja alaraja asettuu 2,5 %:n ja yläraja 97,5 %:n tienoille. Kansainväliset suositukset ohjaavat, että 120 yksilöä on vähimmäismäärä tilastollisten luottamusvälien arvioimiseen epäparametrista menetelmää käytettäessä. Erikoisanalytiikan laboratorioiden puolella vähimmäismäärävaatimus ei ole aivan ehdoton, sillä viiterajoja voidaan tuottaa pienemmistäkin viiteotoksista. (Kairisto 2010, 36–37.)

Viiterajojen yleisenä periaatteena on, että satunnaisesti valitulla terveellä henkilöllä on 95 %:n mahdollisuus saada viitevälille jäävä tulos. Se tarkoittaa sitä, että 5 %:lla terveistä henkilöistä yksittäisen laboratoriotutkimuksen tulos voi jäädä viiterajojen ulkopuolelle. (Eskelinen 2013, viitattu 7.11.2015.) Tämä voidaan selittää sillä, että joskus biologiset muuttujat jakautuvat väestössä sekä yksihuippuisesti ja vinosti, aiheuttaen jakaumien päällekkäisyyttä, jolloin terveiden arvoja voidaan tavata myös sairailta ja sairaiden arvoja terveillä (Kairisto 2004, 33; Kauhanen ym.1998, 82–83). On huomioitavaa, että maantieteelliset erot ja pienetkin geneettiset variaatiot perimässä voivat luonnollisesti muokata viitevälisiä, ja että viiteaineistosta ei aina pystytä karsimaan piilevästi sairaiden henkilöiden tuloksia. Viiterajojen määrittämiseksi on kuitenkin aina valittava oikea menetelmä viitearvoaineiston koon ja lukumäärän mukaan, sillä viiterajat ovat suuresti riippuvaisia jakauman ääripäiden arvoista. (Penttilä 2004, 20; Kairisto 2003, 27.)

Laboratoriotulosten lisäksi lääkäriellä on yleensä muutakin tärkeää diagnostista tietoa potilaasta, joten on hänen vastuullaan arvioida sairauden todennäköisyyttä potilaskohtaisesti. Viiterajoja ei tulisi käyttää sairauden diagnostisina kliinisinä päätösrajoina, kun arvioidaan potilaan hoitotarvetta. Kliiniset päätösrajat toimivat raja-arvoina, jotka ohjaavat klinikon päätöksentekoa. Joskus laboratorioiden laatimat viiterajat ovat kaukana varsinaisista päätösrajoista. Päätösrajojen tuottaminen eri sairauksille on vaativampaa kuin viiterajojen ja vaatii asiantuntijuutta sekä laajaa kliinistä tutkimusaineistoa. (Kairisto 2010, 41). Viitemuutosrajojen avulla lääkärit voivat suhteuttaa laboratoriotutkimusten tuloksia potilaan edellisiin arvoihin, jolloin niiden käyttötarkoituksena on potilaan hoidon monitorointi. Viitemuutosarvot tuotetaan terveiden henkilöiden kahdesta eri aikaan otetusta näytteestä. Viitemuutosarvot voivat antaa tietoa yksilön sisäisestä biologisesta variaatiosta tai esimerkiksi preanalyttisten ja analyttisten tekijöiden vaikutuksesta tutkimusta toistettaessa. (Kairisto 2010, 38–39.)

3 KOLLAGEENIT

Nisäkkäiden elimistössä olevista proteiineista suurin osa on kollageeneja. Kollageenit ovat suuri joukko fibroblastien, osteoblastien ja epiteelisolujen tuottamia rakenneproteiineja ja muodostavat merkittävän osan sidekudoksen soluväliaineen makromolekyyleista. (King 1996–2014, The Medical Biochemistry Page, viitattu 20.9.2015.) Kollageenit vaikuttavat kudosten mekaanisiin toimintoihin ja ylläpitävät kudosten rakenteita esimerkiksi pehmytkudoksissa, luustossa, rustossa, jänteissä, ihossa ja verisuonissa. Kollageenit voidaan jakaa perusrakenteensa puolesta kahteen pääryhmään; säikeisiin ja ei-säikeisiin. Kuitumaisten rakenteiden lisäksi kollageeneja esiintyy myös kalvomaisina verkkorakenteina. (Shoulders & Raines 2010, 929–958, viitattu 1.9.2015) Kollageeneja tunnetaan noin kolmekymmentä geneettisesti erilaista tyyppiä ja sidekudosten toiminnallinen erikoistuminen perustuu osaksi niiden erilaisiin kollageeneihin. Tyyppin I, II ja III kollageenit ovat suurin ryhmä kaikista kollageeneista ja voivat esiintyä kudoksissa myös yhdessä. (Lodish, Berk & Zipursky 2000, luku 22.3, viitattu 1.9.2015.)

3.1 Kollageenien metabolia

Kollageenien synteesi on monimutkainen ketju solun sisäisiä ja ulkoisia vaiheita, jotka johtavat lopulta muutokseen kollageenimolekyylin rakenteissa ja kudosten biomekaanisissa toiminnoissa. Kollageenin on ennen lopullista muotoaan käytävä läpi useita post-translacionaalaisia muutoksia. Kollageenin esiaste on prokollageeni, jossa molekyylin molempiin päihin on liittyneenä suurehko amino- ja karboksiterminaaliset propeptidiasiat. Säikeisten kollageenien propeptidien pitoisuusmittauksilla on mahdollista tutkia kollageenien uudismuodostusta ja hajoamista. (Diegelmann 2001, Collagen Metabolism, viitattu 1.9.2015; Lodish ym. 2000, luku 22.3; Risteli & Risteli 2003, 179.)

Kollageenien muodostuminen ja hajoaminen (turn-over) ovat terveessä elimistössä tarkasti kontrolloituja. Kuitenkin nopean kasvun tai sairauksien yhteydessä kollageenien metabolia muuttuu tai häiriintyy, jolloin kollageenien hajoaminen ja muodostuminen voi olla suurta. Terveessä ja normaalissa kudoksessa kollageeni on täysin hydroksyloitunut ja kolmoiskierteisen rakenteensa vuoksi resistentti hajottaville proteinaaseille. (Diegelmann 2001, Collagen Metabolism, viitattu 15.9.2015.) Esimerkiksi ihokudoksen rikkoutuessa vamman seurauksena, kollageeneja tarvitaan

korjaamaan vaurio ja säilyttämään kudoksen rakenne sekä niiden toiminta (Brett 2008, viitattu 2.2.2015). Muodostuneen kollageenin määrällä on väliä, sillä liian suuri määrä korjaavaa kollageenia johtaa kovettuneen kudoksen syntymiseen ja fibroosiin. Jos kollageenia ei muodostu tarpeeksi, voi seurauksena olla haavojen tai vammojen korjautumattomuus, pitkittynyt paraneminen tai osteoporoosi. Kun alkuperäinen kudoksen kollageeni hajoaa ja korvautuu arven muodossa, sidekudos ei säilytä alkuperäistä ja hyvin tarkasti järjestäytyntä rakennettaan. Korvautunut kollageeni on silloin heikompaa kuin alkuperäinen. Kollageenin synteesi jatkuu kuitenkin kauan kudoksen vaurion tapahtumisen jälkeen ja sen rakenne pyrkii muovautumaan samanlaiseksi kuin ennen vammaa. (Diegelmann 2001, Collagen metabolism, viitattu 15.9.2015.)

Häiriöt kollageenin synteessissä voivat olla seurausta ravitsemuksellisista tekijöistä tai geeneissä tapahtuvista mutaatioista. Sairauksista esimerkiksi osteogenesis imperfecta, Pagetin tauti, rustosairaudet, kasvuhäiriöt, Ehler-Danlosin ja Alportin syndrooma sekä osteoporoosi johtuvat kollageeneihin liitetyistä geenivirheistä (Myllyharju & Kivirikko 2001, 7–21, viitattu 2.10.2015) Tyypin I kollageenilla valtaosa sen mutaatioista johtaa yhden aminohapon muutokseen, yleensä jonkin kolmoiskierteen toistuvan glysiinin vaihtumiseen toiseksi aminohapoksi, minkä seurauksena muodostuva kollageeni on viallista (Pihlajaniemi 2013, 2262–2272, viitattu 2.10.2015). Sidekudosproteiinien geeneissä tapahtuvilla kollageenimutaatioilla on osuutta myös tavallisten sidekudostautien, kuten tuki- ja liikuntaelinsairauksien synnyssä. Saman geenin erilaiset mutaatiot saattavat aiheuttaa hyvin monimuotoisia taudinkuvia, joiden vaikeusaste vaihtelee lievistä vakavampiin komplikaatioihin. (Ala-Kokko & Kuivaniemi 1994, 731, viitattu 2.10.2015.)

3.2 Tyypin I prokollageenin aminoterminaalinen propeptidi

Suurin osa elimistön tyypin I kollageenista on luustossa, missä se muodostaa lähes 95 % luun orgaanisesta matriksista (Välimäki 2000, 191). Elimistössä sitä on noin 70 % kaikista kollageeneista. Perusrakenteeltaan tyypin I kollageenimolekyylillä on pitkä, halkaisijaltaan ohut sauva, joka muodostuu kolmesta toisiinsa kiertyneestä α -polypeptidiketjusta. Kolmoiskierteisten α -ketjujen aminohappojärjestys noudattaa Gly–X–Y toistoja, jossa aina joka kolmas aminohappo on glysiini. Usein proliini ja hydroksiproliini järjestäytyvät säännönmukaisesti ketjussa, mutta niiden tilalla voi olla muitakin aminohappoja. Säikeisten kollageenin suuri vetolujuus ja kestävyys perustuvat tähän ainutlaatuihin kolmoiskierteiseen rakenteeseen (Lodish ym. 2000, luku 22.3, viitattu 5.10.2015.)

Geenit COL1A1 kromosomissa 17 ja COL1A2 kromosomissa 7 ohjaavat prokollageenin esiasteen polypeptidiketjujen muodostumista solulimakalvostossa. Useat entsyymaattiset reaktiot ohjaavat kollageeniketjuja biosynteesin aikana ja sen jälkeen post-translatoionaalisesti. Prolyylihydroksylaasi- ja lysyylihydroksylaasientsyymien aikaansaama proliinin ja lysiinin hydroksylaatio on kriittinen vaihe synteesissä, sillä kollageeniketjuun muodostuvat tärkeät 4-hydroksiproliinitähteet ovat kollageenin kolmoiskierteen kestävyydelle välttämättömiä kehon lämpötilassa. (Koivula, Risteli & Risteli 2012, 921; Pihlajaniemi 2013, 2262–2272.) Kolmoiskierteinen molekyyli rakenne on herkkä hydroksylaasientsyymien kofaktorien eli C-vitamiinin ja raudan puutteelle (Diegelmann 2001, Collagen metabolism, viitattu 15.9.2015).

Prokollageenin muuntuessa tyyppin I kollageeniksi solunulkoisessa tilassa, siitä vapautuu karboksiterminaalinen PICP ja aminoterminalinen PINP propeptiditosa, jotka erittyvät kudostesteisiin ja vereen. Karboksiterminaalilla ja aminoterminalisella propeptidilla on erilaiset kemialliset luonteet ja aineenvaihdunta, vaikka ne periaatteessa kuvastavat samaa biologista ilmiötä. PICP poistuu verestä maksan endoteelisolujen mannoosireseptoreiden kautta, koska se sisältää mannoosisivuketjun. PINP puolestaan poistuu maksan scavenger-reseptorien kautta, sillä se on fosforyloitunut. (Risteli & Risteli 2003, 181.) Ennen lopullista muotoaan kollageenimolekyyli ketjut järjestäytyvät spontaanisti säikeiksi ja kiinnittyvät kovalenttisesti toisiinsa poikkisidoksin. Valmiissa tyyppin I kollageenisäikeessä on kaksi identtistä α 1-ketjua ja yksi α 2-ketju. Tyyppin I kollageenilla on normaalista poikkeavia varianttimuotoja, joita on esiintynyt erilaisissa patologisissa tiloissa. (Koivula ym. 2012, 921.)

Tyyppin I prokollageenin aminoterminalisen propeptidin määräytyminen kertoo tarkimmin luun kollageenin uudistumisnopeudesta ja hajoamistuotteiden pitoisuuksista. S-PINP-pitoisuudet ovat korkeimmillaan lapsuuden kasvukausina ja luunmurtumien paranemisvaiheessa. Normaalissa luun aineenvaihdunnassa luun uudismuodostus ja hajoaminen ovat tasapainossa. Lääkitykset voivat muuttaa luun aineenvaihduntaa, joten S-PINP-mittauksella voidaan seurata hoitovastetta kasvuhormoni-, osteoporoosi- ja estrogeenilääkityksen aikana sekä ennaltaehkäistä liiallisen glukokortikoidihoidon aiheuttamaa altistusta osteoporoosille. PINP-pitoisuuksien vaihtelua tavataan muun muassa maksa- ja munuaissairauksissa. Sydämen patologisilla muutoksilla ja esimerkiksi osteoblastisia ja osteolyttisiä luustometastaaseja lähettävällä rintasyövällä voi olla vaikutusta tuloksiin. PINP voi siten ennustaa rintasyövän prognoosia, levinneisyyttä ja sen

aggressiivisuutta, sekä toimii myös melko luotettavana biomarkkerina eturauhassyövän levinneisyydessä. (Koivula ym. 2012, 925; NordLab 2014, tutkimusohjekirja, viitattu 10.9.2015.)

3.3 Tyypin III prokollageenin aminoterminaalinen propeptidi

Tyypin III kollageeni kuuluu säikeisiin kollageeneihin kuten tyypin I kollageenikin. Nämä kaksi kollageenityyppiä esiintyvät usein yhdessä useissa pehmytkudoksissa. Pehmytkudosten soluväliaineessa on myös muita kollageenityyppejä ja proteiineja sekä proteoglykaaneja. (Risteli & Risteli 2003, 179, 183.) Runsaiten tyypin III kollageenia on elastisissa kudoksissa kuten ihossa, verisuonissa ja sisäelimissä. Tyypin III kollageenin synteesiä säätelee geeni COL3A1 ja sen molekyyli rakenne muodostuu kolmesta α 1-aminohappoketjusta, jotka ovat kiertyneet toistensa ympärille. (Bode 2000, 23, 17, viitattu 10.11.2015.) Tyypin III aminoterminaalinen propeptidi (PIIINP) muodostuu tyypin III kollageenin synteesin aikana samaan tapaan kuin PINP. Ensin kollageenimolekyylin esiasteet järjestäytyvät säikeiksi ja amino- ja karboksiterminaaliset propeptidiosat irtoavat säikeiden pinnalta, jolloin ne siirtyvät verenkiertoon. Intakti PIIINP poistuu maksan endoteelisolujen scavenger-reseptorien kautta. (Bode 2000, 17–19, viitattu 10.11.2015.)

S-PIIINP-määrityksillä voidaan todeta varhaisessa vaiheessa kiihtynyttä fibrogeneesiä ja ylimääräistä sidekudoksen kertymistä sidekudossairauksissa. Maksavaurio voi johtaa kovettununeeseen ja arpeutununeeseen eli kirroottiseen maksaan, jolloin maksan verenkierto ja toiminta häiriintyy. Fibroosi ja kirroosi voidaan todeta yleensä vain maksabiopsialla, mutta S-PIIINP on apuna fibroosiriskin arvioimisessa ja kertoo sidekudosproteiinien aineenvaihdunnasta (Penttilä & Niemelä 2003, 173.) Sidekudosmetabolian aktivoituessa PIIINP-pitoisuudet nousevat ja kohonneita arvoja voidaan todeta myös akuuteissa hepatiiteissa ja maligneissa kasvaimissa, mm. maksa-, rinta- ja munasarjasyövässä. PIIINP-määritys on kliinisesti käytetty myös tilanteissa, joissa maksan toiminta ei vielä ole vaikeasti häiriintynyt, mutta maksafibroosin vaara on kuitenkin olemassa. Esimerkiksi pitkäaikainen lääkehoito voi johtaa maksan toiminnan häiriöihin. PIIINP-määritys antaa tietoa liuotushoidon tehosta sydäninfarktin aikana. Sydänlihaksen kudostuho ja arpeutuminen nostaa PIIINP-pitoisuutta 4-6 vuorokautta vauriosta. PIIINP-pitoisuuksien vaihtelu ei siis ole kovin spesifinen millekään tietylle sairaudelle. (NordLab 2014 tutkimusohjekirja, viitattu 10.9.2015; Risteli & Risteli 2003, 183–184.)

3.4 Kollageenimerkkiaineiden mittausmenetelmät

Kollageenien hajoamista ja muodostumista voidaan mitata veren seerumista immunokemiallisilla menetelmillä. Immunokemialliset määritykset perustuvat antigeenin ja spesifisen vasta-aineen väliseen sitoutumiseen toisiinsa ja leimaamiseen merkkiaineella, jonka avulla tutkittava yhdiste on mahdollista määrittää. Menetelmissä voidaan käyttää kilpailevaan sitoutumiseen ja kaksoisvasta-aineisiin perustuvia tekniikoita. Reaktio-olosuhteet on järjestettävä sellaisiksi, että reaktio on riippuvainen antigeenin pitoisuudesta. Näin menetelmää voidaan käyttää kvantitatiivisiin määrityksiin. Sitoutuneen tutkittavan antigeenin määrä mitataan liittämällä antigeeni-vasta-ainekompleksiin valoa emittoiva merkkiaine, joka mahdollistaa pitoisuuden määrittämisen. (Halonen 2004, 90–92.) PINP-antigeenia esiintyy trimeerisenä ja monomeerisena muotona. Intakti- ja totaali-PINP-määritysmenetelmien avulla trimeeristä ja monomeerista PINP-antigeenimuotoa voidaan mitata käyttämällä erilaisia vasta-ainepareja ja kalibraattoreita. (Koivula ym. 2012, 920, 923–925.)

Käytettävissä on neljä kaupallista immunokemiallista määritysmenetelmää tyypin I kollageenin aminoterminaliselle propeptidille. Intakti-PINP-määritysmenetelmät mittaavat suurempaa trimeeristä PINP-antigeenia eli kolme polymeeriketjua sisältävää propeptidia. Intakti-PINP:lle on aiemmin käytetty manuaalista radioimmunomääritystä eli RIA:a, jossa radioaktiivisen merkkiaineen säteilyaktiivisuus antigeenissa on kääntäen verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. PINP-RIA perustuu kilpailevaan sitoutumiseen määritettävän yhdisteen ja vakiomääräisen leimatun antigeenin välillä polyklonaalisessa anti-PINP-vasta-aineessa. (Koivula ym. 2012, 923.) Radioimmunoanalyysiä käytetään yhä vähenevässä määrin kliinisissä rutiinilaboratorioissa, sillä menetelmä vaatii erillisten säteilytilojen ylläpitoa ja erikoismittalaitteita kuten gammalaskijoita. Käytettyjen merkkiaineiden lyhyt puoliintumisaika, ionisoivan säteilyn haitalliset vaikutukset terveyteen ja reagenssien huono saatavuus ovat myös syynä RIA:n käytön vähenemiseen. (Halonen 2004, 93–94.)

Automaattinen CLIA-menetelmä perustuu kemiluminesenssitekniikkaan, jossa merkkiaineena on kemiluminesoivia molekyyliä. CLIA-menetelmä intakti-PINP:lle on suora, kahteen monoklonaaliseen vasta-aineeseen perustuva sandwich-tyyppinen immunomääritys. IDS-iSYS-analysaattorissa laimennetut näytteet inkuboidaan reaktiokyveteissä näytepuskurin, biotinyloidun vasta-aineen, akridiniumesterillä leimatun vasta-aineen ja streptavidiinilla päällystettyjen rautapartikkeleiden kanssa. Biotinyloitu vasta-aine ja akridiniumesteri-leimattu vasta-aine sitoutuvat näytteen

antigeeniin muodostaen immunokompleksin. Immunokompleksi on kiinni rautapartikkeleissa streptavidiini- ja biotiinimolekyylien sitoutumisen avulla. Analyysaattorissa oleva magneetti vetää immunokompleksiin kiinnittyneet rautapartikkelit reaktiokyvetin pohjalle, ja kaikki immunokompleksiin sitoutumaton aines voidaan pestä pois. Pesun jälkeen laite annostelee reaktiokyvetiin käynnistysreagenssit, jotka saavat aikaan akridiniumesterin kemiluminesenssireaktion. Sinisen valon emittoituminen voidaan mitata ja se on suoraan verrannollinen intakti-PINP:n määrään alkuperäisessä näytteessä. Laitevalmistajan mukaan IDS-iSYS-analyysaattorin mittausrajat ovat 2–230 ng/mL. (Koivula ym. 2012, 923–924; Immunodiagnostic Systems 2012, IDS-iSYS Intact PINP.)

RIA- ja CLIA-menetelmät eivät ole sensitiivisiä pienemmille PINP-antigeenimuodoille. Totaali-PINP-määritys mittaa herkemmin pienempää antigeeniä eli PINP:n yksiketjuista, monomeerista muotoa yhdessä trimeerisen PINP-antigeenimuodon kanssa. Markkinoilla on ELISA-tekniikkaa käyttävä totaali-PINP-määritys ja automaattinen ECLIA-menetelmä. Totaali-PINP:n määrä lisääntyy esimerkiksi munuaisten vajaatoiminnan yhteydessä, sillä sen poistuminen tapahtuu munuaisten kautta. Intakti-PINP-määritys soveltuu paremmin tilaan, jossa munuaisten toiminta on häiriintynyt. (Koivula ym. 2012, 923–925.)

PIIINP-määritykseen on myös yleisesti käytetty RIA-menetelmää, mutta sekin on korvautunut automaattisella Siemens ADVIA Centaur-analyysaattorilla, jonka toiminta perustuu kahteen monoklonaaliseen vasta-aineeseen (sandwich-tekniikka) ja kemiluminesenssiin. Analyysin aikana akridiumesterillä merkitty anti-PIIINP-vasta-aine, biotiinipäällystetty vasta-aine ja streptavidiinilla päällystetyt rautapartikkelit lisätään vaiheittain optimaalisiin reaktio-olosuhteisiin ja PIIINP:n määrä näytteessä on suoraan verrannollinen analyysaattorin havaitsemaan valon määrään.

Siemens Healthcare Diagnostigs Inc.:n tarjoama PIIINP-määritys kuuluu ELF™ (enhanced liver fibrosis) tutkimuspakettiin, jonka avulla voidaan arvioida maksafibroosin astetta ja sen hoitoa. ELF™-testi mittaa fibroosin astetta hyaluronihapon (HA), PIIINP:n ja matriksin metalloproteiinaasien kudoksen inhibiittori 1:n (TIMP-1) avulla seeruminäytteistä. S-PIIINP on yhdessä näiden tutkimusten kanssa varhainen fibrogeneesin ja tulehduksen merkkiaine. Koska nämä kolme määritystä kuuluvat tutkimuspakettiin yhdessä, ei PIIINP:lle ole olemassa erillisenä valmistajan tuottamia viitearvoja. Valmistajan mukaan PIIINP-tutkimus sopii vain seeruminäytteille ja hemolyyysi näytteissä voi pienentää mitattuja PIIINP-pitoisuuksia. Heterofiiliset vasta-aineet ihmisen seeruminäytteissä voivat myös reagoida reagenssien immunoglobiinien kanssa aiheuttaen

muutoksia PIIINP-arvoissa. Valmistajan ilmoittama mittausalue on 0.5–150 ng/mL. (Knudsen, Heickendorff & Nexo 2013, Siemens ADVIA Centaur immunoassay Systems 2011, PIIINP.)

4 TUTKIMUSPROSESSIN KUVAUS

4.1 Viitearvoprojektin suunnittelu, aikataulu ja työnjako

Kollageenimerkkiaineiden viitearvoprojekti käynnistyi NordLabissa vuoden 2014 alussa. Tarve uusille PINP- ja PIIINP-viitearvoille tuli ajankohtaiseksi menetelmätekniikan kehittymisen myötä ja tavoitteena oli myös päivittää edellisiä viitearvoja, jotta ne vastaisivat paremmin suomalaista populaatiota. The International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) ja The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sekä Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV) ovat laatineet työohjeen, joka ohjaa kliinisiä laboratorioita viitearvojen ja viiterajojen muodostamisessa. Viitearvoprojekti noudatti viitevälien muodostamisessa kansainvälistä suositusta: ”Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. EP28-A3c. Volume 28”. NordLabin laboratoriot ovat akkreditoitu ISO 15189 laatustandardin mukaisesti (NordLab 2014, viitattu 8.11.2015).

Tutkimuslupa haettiin NordLabin johtavalta lääkäriltä. Lupa voitiin myöntää neljän ehdon täytyttyä.

1) Laboratorion ylijäämänäytteiden käyttö soveltuu viitearvotutkimukseen, jos soluja ja henkilötietoja ei oteta käyttöön. Tällöin tutkimus ei tarvitse kudoslupaa sairaanhoitopiirin eettiseltä toimikunnalta. 2) Kliinisten tietojen hakeminen tehdään ESKO-potilastietojärjestelmästä ja käynnit tietojärjestelmään kirjataan tutkimustyöksi ja menetelmäkehitystyöksi. 3) Potilastiedot koodataan anonyymeiksi, jolloin salassapito-ongelmia ei ole. 4) Tutkimus ei myöskään puutu potilaan koskemattomuuteen ja näytteenottotilanne ei poikkea tutkimuksen takia normaalista. (Koivula, sähköpostiviesti 24.10.2015.)

NordLabin sairaalakemisti, FT ja dosentti Marja-Kaisa Koivula toimi projektin vastuhenkilönä ja ohjaajana. Koivulalla on aikaisempaa kokemusta laboratorion viitearvojen luomisesta, joten projekti eteni luontevasti hänen ohjeistuksensa mukaan. Omalla vastuullani oli näytekeräyksen suunnittelu ja toteutus. Mukana projektissa oli lääketieteen kandidaatti Jenni Mattila ja hänen vastualueensa oli potilastietojen tarkastus ja viiteaineiston valinta. Tilastoanalyysin teimme yhteistyössä Mattilan ja Koivulan kanssa. NordLabin ylilääkäri, dosentti Leila Risteli toimi kliinisenä asiantuntijana poissulkukriteerien määrittämisessä. Laboratoriossa työskentely ja laitteistojen hallinta oli koulutetun henkilökunnan vastuulla ja he olivat mukana analyysien suorittamisessa.

Uudelle automaattiselle PIIINP-menetelmälle tehtiin validointi kevään 2014 aikana ennen viitearvojen määrittämistä. PIIINP-menetelmän validoinnissa määritettiin tutkimuskohtaiset kliiniskemialliset rajat, mitattiin herkkyyttä ja tarkkuutta sekä vertailtiin uutta metodologia vanhempaan metodiin. Tavoiterajojen määrittämisellä voitiin tarkkailla analyysin toistettavuutta siten, että suorituskyky pysyisi hyvänä ja analyytin kokonaisvirhe pysyisi rajojen sisällä.

4.2 Näytekeräys ja aineiston valinta

Viiteväestöksi valittiin suomalaiset 0–65-vuotiaat miehet ja naiset, jaoteltuna pienempiin ikäryhmiin sukupuolen mukaan. Näytekeräys aloitettiin helmikuussa 2014. Tarkkaa aikataulua keräykselle ei tehty, sillä näytteiden kertymistä aineistoa varten ei aluksi osattu arvioida. Tavoitteena oli kerätä jokaiseen iän ja sukupuolen mukaisesti jaoteltuun viiteryhmään vähintään 20 näytettä. Vähimmäismäärä tutkimusaineistolle oli 360 hyväksyttyä ylijäämänäytettä.

Aktiivinen näytekeräys kesti koko kevään ja kesäkuun ajan. Laboratorioiden henkilökunnalle ilmoitettiin kirjallisesti viitearvoprojektista ja pyydettiin säilyttämään jo analysoidut näytteet projektia varten. Bioanalyytikko-opiskelijana minun vastuullani oli näytteiden keruu, kirjaus ja säilytys. Keräsin ylijäämänäytteitä aluksi NordLabin erityisanalytiikan ja lasten laboratorion ja myöhemmin päivystyslaboratorion. Näytteinä kerättiin mahdollisimman tuoreita tai valmiiksi eroteltuja pakastettuja seeruminäytteitä, jotka olivat jo käyneet läpi pyydetyt analyysiprosessit.

PINP- ja PIIINP-pitoisuuksiin vaikuttavat vain vähäisesti vuorokautinen tai vuodenaikainen vaihtelu, joten näihin preanalyttisiin tekijöihin ei ollut tarvetta kiinnittää huomiota. Hemolyytisiä, ikteerisiä tai lipeemisiä näytteitä ei hyväksytty keräykseen. Kerätyt näytteet säilytettiin pakastimessa -20 °C:n lämpötilassa analysointiin saakka. Laboratorioprosessien ja olosuhteiden vakioimisessa sekä näytteiden käsittelyssä noudatettiin yhtenäisiä ohjeita. Näytteiden säilyvyys oli varmistettu, kuten myös säilytyslämpötilan menetelmäkohtainen vaikutus analyysiin, sillä menetelmän väärä vakiointi olisi voinut johtaa systemaattisesti liian korkeisiin tai mataliin arvoihin. Jokaisen näytteen tiedot dokumentoitiin tarkasti lasketun iän mukaan omaan ryhmäänsä.

Viitearvotutkimukseen osallistuvilla määriteltiin tarkat poissulkukriteerit, jotta sairaiden viitehenkilöiden tuloksia ei voisi sekoittaa terveiden viitehenkilöiden tuloksiin. Tutkimukseen ei valittu sellaisten henkilöiden näytteitä, joilla oli luun tai kollageenin metaboliaan vaikuttavia tiloja tai sairauksia. Vammat tai kirurgiset operaatiot lisäävät tyypin I kollageenin synteesiä ja näin voivat vaikuttaa PINP-määrityksiin. Myös taudit, jotka vaikuttavat pehmytkudosten fibroosiin voivat näkyä PINP- ja PIIINP- pitoisuuksien muutoksina. Useita sairauksia hoidetaan glukokortikodeilla, jotka vaikuttavat tyypin I kollageenin synteesiin. Glukokortikoidilääkkeitä käytetään esimerkiksi tulehduksellisiin suolistosairauksiin ja nivelreumaan. (Koivula ym. 2012, 925.) Näin ollen, luun murtumat kuluneen vuoden aikana, mikä tahansa luusto-, kardiovaskulaarinen tai gastrointestinaalinen sairaus, maksa-, keuhko- tai munuaisvika, diagnostinen endokrinologinen tai kasvuun liittyvä häiriö, sekä mikä tahansa syöpä olivat poissulkukriteerejä. Jokainen viitehenkilö kävi läpi tarkan valintaseulan, jonka suoritti lääketieteen kandidaatti Jenni Mattila yhdessä ylilääkäri Leila Ristelin kanssa. Terveystietoa tarkastettiin terveystietoista OYS:n ESKO-potilastietojärjestelmästä.

Näytekeräys sujui alkuun hyvin ja joihinkin ryhmiin kerättiin paljon ylimääräisiäkin näytteitä. Neljännen näytekeräyskuukauden aikana kävi kuitenkin ilmi, että tietyistä ryhmistä puuttui huomattava määrä tutkimukseen soveltuvia näytteitä tiukkojen osallistumiskriteereiden takia. Projektille oli todellinen haaste kerätä nämä puuttuvat näytteet ajoissa venyttämättä tutkimusprojektin kestoa liiaksi. Laajensimme silloin keräystä NordLabin päivystyslaboratorioon. Näytekeräystä jatkettiin kesäkuun puolelle. Näytekeräyksen loputtua näytteiden koodaus anonyymeiksi tehtiin poistamalla nimet ja henkilötunnukset ja numeroimalla näytteet juoksevilla numerokoodilla. Näin näytteiden antamia PINP- ja PIIINP- tuloksia ei voitu suoraan tunnistaa henkilötiedoista. Aineiston huolellinen numerokoodaus oli tärkeää suuren näytemäärän vuoksi.

4.3 Näytteiden analysointi immunoanalysaattoreilla

Näytteiden analysointi suoritettiin automaattisilla PINP- ja PIIINP- analysaattoreilla kesäkuussa 2014 ohjaavan laboratoriohenkilökunnan kanssa. Näytemäärän vuoksi emme analysoineet kaikkia näytteitä kerralla. Näytteiden analysoimiseen meni noin viikko. Näytteiden ajoa varten seeruminäyteputket piti ensin sulattaa huoneenlämpöiseksi vesihauteessa sekä sekoittaa huolellisesti.

Automaattisella IDS-iSYS-analyssaattorilla mittasimme kvantitatiivisesti intaktia tyypin I prokollageenin aminoterminaalista propeptidia seerumista. Ikäryhmien vaikutus PINP-pitoisuuksiin tiedostettiin jo ennen analyysiprosessia, joten vastasyntyneiden ja pienten lasten PINP-näytteet laimennettiin ennen analysointia suhteella 1:10 tai 1:20. PINP-näytteiden tuloksissa huomioon otettiin vain laimentamattomien näytteiden tulokset, jos näyte oli suuren PINP-pitoisuutensa vuoksi analysoitu kahteen kertaan. Käsien tehtävien laimennusten pipetointivirheiden mahdollisuus on suurempi, joten oli luotettavampaa käyttää ei-laimennettujen näytteiden tuloksia. Laimennettujen näytteiden lopulliset tulokset laskettiin myöhemmin manuaalisesti laimennuskertoimella 10:llä tai 20:llä. Kaikki saadut tulokset syötettiin käsin taulukko-ohjelma Microsoft Exceliin.

PINP-määritysten jälkeen näytteet siirrettiin Siemens ADVIA Centaur-analyssaattorille PIIINP-määrittystä varten. Automaattisessa Siemens ADVIA Centaur-laitteessa tulokset tallentuivat suoraan sähköisesti levykkeelle ja analyssaattorissa oli myös automaattinen laimennus korkeille mittaustuloksille, joten tulokset datasta voitiin siirtää suoraan Exceliin.

4.4 Tilastollinen analyysi

Siirsimme PINP- ja PIIINP- tulokset Exceliin ja tarkastimme, että jokaiselle potilaalle ja näytenuumerolle löytyi tulos. Tilastollinen analyysi tehtiin tulosten kirjausten jälkeen kesä-heinäkuussa 2014. Teimme Jenni Mattilan kanssa omat tilastoanalyysimme, joita sitten myöhemmin vertailimme tulosten luotettavuuden vuoksi. Koska tulosten siirrosta tietokoneelle ja sähköiseen muotoon oli pientä epävarmuutta, kävimme myös raakadatan eli alkuperäisen datan läpi varmistuaksemme, että tulokset olivat siirtyneet oikein Excel-ohjelmaan. Data täytyi muuttaa Excel-ohjelmalla histogrammeiksi, jotta visuaalisesti tarkastelemalla niistä voitiin havaita koko viiteaineiston jakauman muoto. Normaalijakauman mukaiselle aineistolle käytimme parametrisia testejä. Parametristen menetelmien käyttö edellyttää, että aineiston otoskoko on riittävä ja viiteyksilöt ovat satunnaisesti valittuja. Tulokset eli havainnot ovat toisistaan riippumattomia ja niiden mittaustaso on jatkuva eli välimatka-asteikko, josta poikkeavat arvot on poistettu. (Koivula, sähköpostiviesti 24.10.2015.)

Datavirheet ja outlierit eli havaintopikkeamat voidaan havaita tilastomatemaattisilla laskukaavoilla ja muodostamalla tuloksista histogrammi. Aineistosta erottuva outlier on poikkeavan suuri tai pieni

arvo, joka voi vääristää tilastoanalyseja. Outlier voi johtua systemaattisesta tai satunnaisesta mittausvirheestä. Toisinaan poikkeavan suuria tai pieniä arvoja esiintyy tuntemattomista syistä eikä poikkeamia voida jäljittää. Havaintopikkeamat tulee poistaa ennen viiterajojen laskemista. (Math Open Reference 2009, viitattu 15.10.2015.)

Järjestimme PINP- ja PIIINP- tulokset iän ja sukupuolen mukaan oikeisiin ryhmiin. Tilastollinen analyysi viitevälien määrittämiseksi tehtiin laskemalla jokaiselle viiteryhmälle PINP- ja PIIINP- tulosten keskiarvo (KA), jossa ryhmän mitatut tulokset laskettiin yhteen ja jaettiin saatu summa havaintojen määrällä.

KAAVA 1. Aritmeettisen keskiarvon laskukaava (KvantiMOT 2003, viitattu 15.10. 2015)

$$\text{Keskiarvo} = \frac{\text{Havaintojen summa}}{\text{Havaintojen määrä}}$$

Laskimme ryhmille myös keskihajonnan (SD tai S). Keskihajonta kuvaa arvojen vaihtelua keskiarvon molemmin puolin. Se siis ilmaisee keskimääräisen poikkeaman keskiarvosta.

KAAVA 2. Keskihajonnan laskukaava (KvantiMOT 2003, viitattu 15.10.2015)

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Poistimme aineistosta tulokset, jotka menivät havaintopikkeaman raja-arvojen yli tai niiden alle. Havaintopikkeaman poiston jälkeen määritimme muokatulle aineistolle keskiarvon ja keskihajonnan sekä jatkoimme havaintopikkeamien etsimistä niin pitkälle, kunnes poikkeavia arvoja ei aineistosta enää löytynyt.

KAAVA 3. Havaintopikkeaman laskukaava

$$\text{Havaintopikkeama} = \text{KA} \pm 3 \times \text{SD}$$

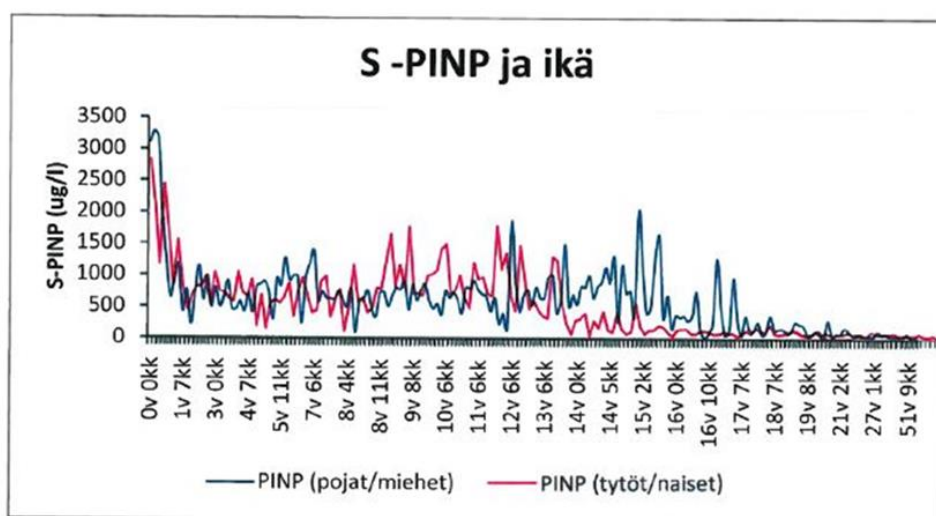
Viimeiseksi ylä- ja alarajat viiteväleille laskettiin alla olevalla kaavalla.

KAAVA 4. Viiterajojen laskeminen

$$\text{Viitevälien ylä- ja alarajat} = \text{KA} \pm 2 \times \text{SD}$$

5 Uudet viitevälit ja tulosten kuvaajat

Uudet S-PINP-viitevälit sukupuolen ja ikäryhmän mukaisesti näkyvät taulukossa 1. 0–7-vuotiaille lapsille ei määritetty erikseen viitevälejä sukupuolen mukaan. Ryhmiä yhdisteltiin tilastoanalyysin aikana tulosten samankaltaisuuksiin vuoksi, jolloin ne muokkautuivat uusiksi ikäryhmiksi. Kuten viiteväleistä voi havaita, PINP-pitoisuudet lapsuuden kasvukausina voivat vaihdella huomattavasti. Tyttöjen ja poikien viiteväleissä eroavaisuudet näkyvät selkeimmin murrosiässä ja miehillä kasvukausi kestää myöhempään kuin naisilla. PINP-pitoisuudet laskevat, kun luuston kasvukausi on ohi. Aikuisilla kollageenien aineenvaihdunta on tasaisempaa, mutta luun hajoaminen kiihtyy vanhuudessa. Uudet S-PINP-viitevälit eroavat aiemmin käytössä olleista viiteväleistä (Taulukko 2.) erilaisen paikallisen viiteaineiston ja ikäryhmiensä vuoksi, joten viitearvot eivät ole aivan vertailukelpoisia keskenään.



KUVIO 1. S-PINP ja ikä (NordLab 2014, S-PINP, viitattu 10.11.2015)

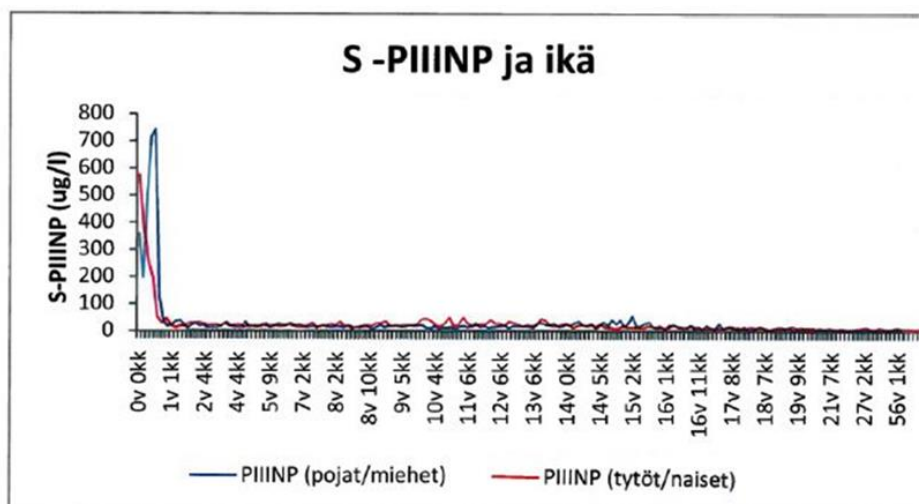
TAULUKKO 1. Uudet PINP-viitevälit ikäryhmittäin

Ikä ja sukupuoli	Viitevälit	
alle 1 v	724 - 3746	µg/l
1 v	0 - 1873	µg/l
2-3 v	336 - 1146	µg/l
4-5 v	210 - 1122	µg/l
6-7 v	70 - 1398	µg/l
pojat 8-9 v	259 - 1020	µg/l
tytöt 8-9 v	80 - 1400	µg/l
pojat 10-11 v	340 - 1004	µg/l
tytöt 10-11 v	303 - 1593	µg/l
pojat 12-13 v	64 - 1484	µg/l
tytöt 12-13 v	0 - 1682	µg/l
pojat 14-15 v	2 - 1744	µg/l
tytöt 14-15 v	0 - 470	µg/l
miehet 16-17 v	0 - 1176	µg/l
naiset 16-17 v	6 - 210	µg/l
miehet 18-19 v	0 - 368	µg/l
naiset 18-65 v	17 - 100	µg/l
miehet 20-65 v	11 - 145	µg/l

TAULUKKO 2. Entiset PINP-viitevälit ikäryhmittäin

Ikä ja sukupuoli	Viitevälit	
lapset 0-1 v	330 - 1222	µg/l
lapset 2-3 v	165 - 920	µg/l
lapset 4-5 v	225 - 990	µg/l
lapset 6-7 v	200 - 990	µg/l
pojat 8-9 v	400 - 970	µg/l
tytöt 8-9 v	180 - 1340	µg/l
pojat 10-11 v	300 - 1190	µg/l
tytöt 10-11 v	380 - 1315	µg/l
pojat 12-13 v	145 - 1190	µg/l
tytöt 12-13 v	75 - 715	µg/l
pojat 14-15 v	140 - 1030	µg/l
tytöt 14-15 v	50 - 340	µg/l
pojat 16-17 v	60 - 610	µg/l
tytöt 16-17 v	15 - 165	µg/l
pojat 18-19 v	25 - 365	µg/l
tytöt 18-19 v	20 - 150	µg/l
miehet 20-65 v	20 - 76	µg/l
naiset 20-65 v	19 - 84	µg/l

Uudet PIIINP-viiterajat automaattiselle Siemens ADVIA Centaur CLIA-menetelmälle ovat nähtävissä taulukossa 3. PIIINP-pitoisuudet ovat syntymän jälkeen ja alle kahden vuoden ikäisillä vauvoilla korkeita, mutta laskevat sen jälkeen. Tämä johtuu syntymän jälkeisestä pehmytkudosten kasvusta ja tyypin III kollageenin kiihtyneestä aineenvaihdunnasta. Uusia ja edellisiä PIIINP-viiterajoja ei voi suoraan vertailla, sillä analyysimenetelmät ja tulostasot eroavat toisistaan suuresti.



KUVIO 2. S-PIIINP ja ikä (Nordlab 2014, S-PIIINP, viitattu 10.11.2015)

TAULUKKO 3. Uudet PIIINP-viiterajat ikäryhmittäin

Ikä ja sukupuoli	Viiterajat
0-1 v	alle 850 µg/l
yli 2 v	alle 50 µg/l

Uudet viitearvot S-PINP ja S-PIIINP tutkimuksille otettiin NordLabissa käyttöön elokuussa 2014. S-PIIINP mittaus taso muuttui menetelmämuutoksen myötä. RIA-menetelmän aikana alamittausraja oli 0.3 µg/l. Nykyisen CLIA-menetelmän alamittausraja on 0.5 µg/l. (NordLab 2014, tiedote 41 ja 42, viitattu 10.11.2015.) Liitteistä 1-18 löytyy S-PINP:n ja S-PIIINP:n viiteryhmiä tarkemmat kuvaajat ja taulukot sukupuolen ja iän mukaisesti.

6 POHDINTA

PINP- ja PIIINP-viitearvoprojektin tarkoituksena oli luoda viitearvot uudelle automaattiselle mittausten menetelmälle sekä luoda uudet viitearvot suomalaisen väestön käyttöön. Laboratorion omien viiteväliä määrittäminen uusille mittausten menetelmille on usein pitkä ja aikaa vievä prosessi. Kansainvälisten viiteväliäsuositusten noudattaminen kuitenkin nostaa ja ylläpitää klinisen laboratoriotyön laatua. Jotta menetelmäkehitystyö olisi asianmukaista, tarvitaan monen eri ammattiryhmän yhteistyötä valmiiseen lopputulokseen. Viitearvoprojekti onnistui tuottamaan uudet PINP- ja PIIINP viitevälit Nordlabin käyttöön ja vahvisti moniammatillisuutta sekä yhteistyötä korkeakoulujen ja Nordlabin kesken. Lisäksi opetus- ja tutkimustoiminnan yhdistäminen hyödytti kaikkia osapuolia.

Tutkimuksen luotettavuus pyrittiin pitämään korkeana koko projektin ajan. Asiantuntijoiden laatimat viitehenkilöiden tarkat osallistumiskriteerit olivat olennainen osa viitearvojen määrittämistä, jotta viitearvoaineisto todella koostui terveistä henkilöistä. Vaikka ESKO-tietojärjestelmä palveli hyvin potilastietojen keräämisessä, on silti mahdollista että viiteaineiston joukkoon on eksynyt viitehenkilöitä, jotka eivät täytä osallistumiskriteereitä terveydentilan suhteen. Tämä on kuitenkin todellisuutta monissa muissakin viitearvoprojekteissa, joten kenties erilainen näytteenkeruumenetelmä voisi olla luotettavampi, jos halutaan vähentää tätä ilmiötä. Haastattelulomakkeilla olisi mahdollista tiedustella viitehenkilöiltä esimerkiksi mahdollisista lääkityksistä tai vammoista, jos niistä ei ole mainintaa potilastietojärjestelmässä. Ylijäämänäytteiden käyttäminen on silti laboratorioille eettisin tapa tuottaa viitearvoja, varsinkin kun kyseessä ovat terveiden lasten viitearvot. Tällöin vältetään ylimääräistä näytteenottoa ja pienille lapsille aiheutuvaa haittaa. Toisenlaiset viitearvonäytteiden keräykset olisivat vaatineet sairaanhoitopiirin eettisen toimikunnan luvan, sillä näytteenottotilanne olisi poikennut viitearvotutkimuksen takia.

Tilastanalyysissä kävimme hyvin tarkasti läpi aineiston poikkeavat tulokset ja teimme tulosten vertailua Marja-Kaisa Koivulan ohjauksella. Oletimme terveiden aineiston olevan normaalijakautunut, mutta on mahdollista, että viiteryhmiä välillä on eroja. Jatkoarviointia tutkimukselle voisi vielä tehdä tarkastamalla onko aineisto todella symmetrisen normaalijakauman mukainen. Jos näin ei ole, pitäisi viitevälit määrittää matemaattisia transformaatiomenetelmiä käyttäen. Koko viitearvoprojekti ja sen aineisto dokumentoitiin, joten tuloksia on vielä mahdollista tarkastella

oikeellisuuden nimissä. Viitearvotutkimuksen eettisyys juontuu vahvasti tulosten oikeellisuudesta, sillä viitearvot ovat merkityksellisiä potilaiden hyvälle hoidolle.

Yleisestikin viitearvojen päivittäminen nykyaikaan on tarpeellista, sillä elinolosuhteissa ja väestön rakenteessa sekä terveydentilassa voi tapahtua muutoksia vuosikymmenien kuluessa. PINP- ja PIIINP-viitevälit ovat silti vain suuntaa antavia, eikä diagnoosia saisi koskaan perustaa yksinään laboratoriotuloksen arvoon. Hoitopäätöksiin vaikuttavat jatkotutkimusten lisäksi potilaan terveydellinen status ja hoidollinen tavoite. Harvinaisemmille laboratoriotutkimuksille viitevälien luominen voi olla hankalampaa, jos käytössä ei ole vertailukelpoisia referenssilaboratorioiden tuloksia. Uudet määritetyt viitearvot voivat kuitenkin olla mukana yhtenäistämässä kollageenimerkkiaineiden analytiikan menetelmiä myös kansainvälisesti.

Projektiluonteiselle työlle on tärkeää hyvä suunnittelu ja työnjako, viestintä, toimivat aikataulut ja laadukas toteutus. Projektin aikataulujen suunnittelu oli vaikeaa, sillä projektin kokonaiskesto ei voinut kunnolla arvioida etukäteen. Projektissa koimme haasteita suurehkon viiteaineiston keräämisessä, sillä tarpeeksi suuri määrä sopivia viiteyksilöitä oli yllättävänkin hankala löytää. ESKO-potilasjärjestelmän avulla tehtävä aineiston valinta oli vaativa ja vastuullinen prosessi, joten siihen tarvittiin paljon työtunteja. Näytekeräyksen parempi organisointi olisi ehkäissyt pientä näytehävikkiä. Analyysivaiheessa mittausvirheiden mahdollisuutta olisi minimoitu ajamalla jokainen näyte kahteen kertaan. Projektin edellytys oli tietosuoja-asioiden ja tutkimushenkilöiden anonymiteetin ylläpitäminen, jossa onnistuimme hyvin. Omalta osaltani voin sanoa, että opin paljon projektityöstä.

Viitearvoprojektin kautta sain tilaisuuden oppia tilastollisista menetelmistä ja kollageeneista sekä niihin liittyvistä mielenkiintoisista tutkimuksista. Projekti lisäsi ymmärrystäni laboratoriotutkimusten viitearvojen merkityksestä itse laboratoriolle, yksilölle ja väestölle. Tulosten tulkitseminen viiterajojen avulla on tärkeä osa postanalyttistä prosessia ja vaikuttaa potilaiden hoitoon. Vaikka tutkimuskohtainen analytiikka kehittyy harppauksilla kohti nopeampia automaatioprosesseja ja uusia merkkiaineita kehitellään sairauksien seulontaan, ei tulosten tulkintaa voi tehdä luotettavasti ilman hyvin ja perusteellisesti laadittuja viitearvoja.

LÄHTEET

Ala-Kokko, L & Kuivaniemi, H. 1994. Geenivirheet harvinaisten ja tavallisten sidekudossairauksien taustalla. Katsaus. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 1994 110 (21), 2262—2272. Viitattu 2.10.2015.

http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&viewType=viewArticle&tunnus=duo40150&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth

Aytekin, M & Emerk, A. 2008. Accurate Reference Intervals Are Required for Accurate Diagnosis and Monitoring of Patients. eIFCC 2008 19 (2). Viitattu 18.9.2015. <http://www.ifcc.org/ifcc-communications-publications-division-%28cpd%29/ifcc-publications/ejifcc-%28journal%29/e-journal-volumes/ejifcc-2008-vol-19/vol-19-n%C2%B0-2/accurate-reference-intervals-are-required-for-accurate-diagnosis-and-monitoring-of-patients/>

Bode, M. 2000. Characterization of type I and type III collagens in human tissue. Väitöskirja. Oulun yliopisto. Oulu. Viitattu 10.11.2015. <http://herkules oulu.fi/isbn9514255534/isbn9514255534.pdf>

Brett, D. 2008. A Review of Collagen and Collagen-Based Wound Dressings. Wounds 2008 20 (12). Viitattu 2.2.2015. <http://www.woundsresearch.com/content/a-review-collagen-and-collagen-based-wound-dressings>

Diegelmann R.F. 2001. Collagen Metabolism. Wounds 2001 13 (5). Viitattu 15.9.2015. <http://www.medscape.com/viewarticle/423231>

Eskelinen, S. 2013. Mitä tarkoittaa viitearvo. Terveyskirjasto. Viitattu 7.11.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk02060

Felding, P. Franzon, L. Kairisto, V. Petersen, P. Rustad, P & Simonsson, P. Pohjoismainen viitearvoprojekti. Viitattu 17.10.2015. http://pweb.furst.no/norip/REFP_finsk.htm

Gräsbeck, R. 2004. The evolution of the reference value concept. Clin Chem Lab Med 2004 42 (7), 692–697. Viitattu 10.2.2015. http://www.academia.edu/6329500/The_evolution_of_the_reference_value_concept

Halonen, T. 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa I. Penttilä (toim.) Kliiniset Laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY.

Hajontaluvut: keskihajonta. 2003. KvantiMOTV. Viitattu 15.10.2015.
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html>

Ihalainen, J. 2012. Paraniko maailma pohjoismaisella viiteväliprojektilla? Moodi 36 (3), 116–119.

Immunodiagnostic Systems. 2012. IDS-iSYS Intact PINP. Instructions for Use. IS-400. England.

King, M. 1996–2014. The extracellular matrix. The Medical Biochemistry Page. Viitattu 20.9.2015.
<http://themedicalbiochemistrypage.org/extracellularmatrix.php>

Lodish, H. Berk, A. Zipursky, SL et. al 2000. Collagen: The Fibrous Protein of the Matrix. Molecular Cell Biology. 4th Edition. New York: W.H. Freeman. Viitattu 1.9.2015.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/>

Kairisto, V. 2010. Laboratoriotuloksen tulkinta. Teoksessa O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Keuruu: Kandidaattikustannus Oy.

Kauhanen, J. Myllykangas, M. Salonen, J & Nissinen, A. 1998. Kansanterveystiede. 2. painos. Porvoo: WSOY.

Kauhanen, J. Erkkilä, A. Korhonen, M. Myllykangas & M. Pekkanen, J. 2013. Kansanterveystiede. 4.painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Keskiluvut: aritmeettinen keskiarvo. 2003. KvantiMOTV. Viitattu 15.10.2015.
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/keskiluvut/keskiluvut.html>

Koivula, M-K. Risteli, L & Risteli, J. 2012. Measurement of aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum. Clinical Biochemistry 2012 45, 920–927.

Koivula, M-K. 2015. Opinnäytetyö. Sairaalakemisti. NordLab. Sähköpostiviesti. 24.10.2015.

Linko, L. Ahonen, E. Eirola, R. Ojala, M. 2000. Laboratoriopalvelut hoitotyön tukena. 1.painos. Juva: WSOY.

Math Open Reference. 2009. Outlier. Viitattu 15.10.2015. <http://www.mathopenref.com/outlier.html>

Myllyharju, J. Kivirikko, KI. 2001. Collagens and Collagen-Related Diseases. Annual Medicine 2001 33 (1), 7–21. Viitattu 2.10.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11310942>

NordLab Oulu. 2014. Ohjekirja. Prokollageeni I:n aminotermin. propeptidi, seerumista. Viitattu 10.9.2015. <http://oyslab.fi/ohjekirja/4496.html>

NordLab Oulu. 2014. Ohjekirja. Prokollageenin III:n aminotermin. propeptidi, seerumista. Viitattu 10.9.2015. <http://oyslab.fi/ohjekirja/3682.html>

NordLab. 2014. Laatu. Viitattu 8.11.2015. <http://www.nordlab.fi/fi/nordlab/laatu>

NordLab. 2014. Prokollageeni I:n aminoterminaalisen propeptidin viitearvomuutos. Tiedote 42/2014. Viitattu 10.11.2015. http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/labtied_2014_42_pinp.pdf

NordLab. 2014. Prokollageeni III:n aminoterminaalisen propeptidin menetelmä- ja viitearvomuutos. Tiedote 41/2014. Viitattu 10.11.2015. http://www.nordlab.fi/sites/default/files/pdf_uploads/labtied_2014_41_piinp.pdf

Orion Diagnostica. 2007. UniQ PIIINP RIA Radioimmuno-assay kit. Espoo. Finland.

Penttilä, I & Niemelä, O. 2003. Maksan laboratoriotutkimukset. Teoksessa J. Vilpo & O. Niemelä (toim.) Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Kandidaattikustannus Oy.

Penttilä, I. 2004. Viitearvot ja niiden määrittäminen. Teoksessa I. Penttilä (toim.) Kliiniset Laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY, 18.

Pihlajaniemi, T. 2013. Soluväliaineen tutkimuksen monet ulottuvuudet. Äyräpään luento. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 129 (21), 2262–2272. Viitattu 2.10.2015. http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/uusinnumero;jsessionid=B88454C3055C5F43D0E0955DD3C43090?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_lifecycle=0&Article_WAR_DL6_Articleportlet_p_frompage=uusinnumero&Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo11296

Risteli, J & Risteli, L. 2003. Luusto ja muut sidekudossairaudet. Teoksessa J. Vilpo & O. Niemelä (toim.) Laboratoriolääketiede –Kliininen kemia ja hematologia. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Kandidaattikustannus Oy.

Sarpola, A. Luku 3 Todennäköisyyslaskennan perusteita. Internetix. Viitattu 15.10.2015. <http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/matematiikka/mb3/normaalijakauma>

Shoulders, M & Raines, R. 2009. Collagen Structure and Stability. Annual Review of Biochemistry 78, 929–958. Viitattu 1.9.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846778/>

Siemens Immunoassay Systems. 2011. ADVIA Centaur PIIINP.

Soendersoe Knudsen, C. Heckendorff ,L & Nexø, E. 2013. Measurement of aminoterminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) employing the ADVIA Centaur platform. Validation, reference interval and comparison to UniQ RIA. De Gruyter 10. Clin Chem Lab Med 2013.

Terveydenhuoltolaki. 30.12.2010/1326.

Välimäki, M. 2000. Luusto ja mineraaliaineenvaihdunta. Teoksessa M. Välimäki, T. Sane & L. Dunkel (toim.) Endokrinologia. 1.painos. Hämeenlinna: Duodecim.

LIITTEET

Liitteet 1-18

S-PINP ja S-PIIINP taulukot ja kuvat