



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# LIKVORIN SOLUJEN SÄILYVYYS

Mari Katajamäki

Heini Pellinen

Opinnäytetyö  
Lokakuu 2015  
Bioanalytikkokoulutus



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Bioanalytikkokoulutus

KATAJAMÄKI, MARI & PELLINEN, HEINI:  
Likvorin solujen säilyvyys

Opinnäytetyö 35 sivua, joista liitteitä 2 sivua  
Lokakuu 2015

---

Likvor eli aivo-selkäydinneste on verestä suodattamalla muodostunutta nestettä, joka ympäröi aivoja ja selkäydintä. Likvor on tavallisesti kirkasta ja väritöntä, eikä siinä ole soluja. Likvorista otetaan näyte lumbaalipunktiolla epäiltäessä meningiittiä eli aivokalvontulehdusta, lukinkalvon alaista verenvuotoa tai muuta keskushermoston sairautta. Solujen esiintyminen näytteessä voi indikoida jotakin edellä mainituista sairauksista. Solujen lisäksi likvorista tutkitaan muita analyyttejä, kuten proteiineja ja glukoosia.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia likvornäytteen solujen säilymistä ja vertailla erytrosyyttien ja leukosyyttien säilyvyyttä keskenään. Opinnäytetyön aihe saatiin Fimlab Laboratoriot Oy:ltä eli opinnäytetyö on työelämälähtöinen. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa uutta ja ajantasaista tietoa likvornäytteen solujen säilymisestä Fimlab Laboratoriot Oy:lle.

Tutkimus oli menetelmältään kvantitatiivinen, sillä opinnäytetyössä seurattiin likvorin erytrosyyttien ja leukosyyttien määrän mahdollista muuttumista eri ajanjaksoina. Näitä solujen muutoksia voitiin laskea matemaattisesti ja tehdä niiden perusteella päätelmiä likvorin säilyvyydestä.

Opinnäytetyön kokeellinen osio koostui 15 potilasnäytteestä, joista 11 saapui sekä säilytettiin huoneenlämmössä ja 4 kylmässä. Näytteiden solut laskettiin välittömästi, 1 tunnin, 2 tunnin, 4 tunnin ja 24 tunnin kuluttua näytteen laboratorioon saapumisesta. Lasketuista tuloksista selvitettiin erytrosyytti- ja leukosyyttimäärien muutos verrattuna alkuperäisiin solumääriin.

Tutkimuksesta ei saatu selkeää, yhdenmukaista tulosta. Ensimmäisten tuntien aikana laskettu solumäärä kasvoi osassa näytteitä. Vuorokauden säilytyksen jälkeen lähes kaikkien näytteiden laskettu solumäärä oli pienentynyt sekä erytrosyyttien että leukosyyttien osalta. Tutkimuksen perusteella vaikuttaa siltä, että erytrosyytit säilyisivät likvornäytteissä leukosyyttejä paremmin.

---

Asiasanat: likvor, solut, säilyvyys, erytrosyytit, leukosyytit, solulaskenta

## **ABSTRACT**

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

**KATAJAMÄKI, MARI & PELLINEN, HEINI:**  
Cell Survival in Cerebrospinal Fluid

Bachelor's thesis 35 pages, appendices 2 pages  
October 2015

---

The purpose of this study was to examine cell survival in cerebrospinal fluid and compare the survival of leukocytes and erythrocytes. The objective of the study was to gather current information on cell survival and the effect of storage on cells in cerebrospinal fluid samples.

The data consisted of fifteen patient cerebrospinal fluid samples from wards of Tampere University Hospital. Eleven samples arrived and were stored at refrigerator temperature and four samples at room temperature. The cells were counted immediately after arrival and at time points of one, two, four and twenty-four hours. The data were analysed by means of quantitative method.

The results were inconclusive. During the first hour of storage the number of cells increased in some samples. After twenty-four hours of storage the number of erythrocytes and leukocytes had decreased in nearly all of the samples. Based on this study, it would seem that erythrocytes survive in cerebrospinal fluid samples better than leukocytes.

Due to restricted amount of time, the data collected was very limited. Further research is required to investigate cell survival and the effect of time and temperature on cerebrospinal fluid samples.

---

Key words: cerebrospinal fluid, cells, survival, erythrocyte, leukocyte, cell count

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	LIKVOR.....	7
3	LIKVORIN SOLUJEN LABORATORIODIAGNOSTIIKKA.....	9
	3.1 Likvornäytteen indikaatiot ja näytteenotto .....	9
	3.2 Solujen kammiolaskenta .....	10
	3.3 Solulöydösten kliininen merkitys .....	12
4	LIKVORIN SOLUJEN SÄILYMINEN .....	13
	4.1 Erytrosyytit .....	13
	4.2 Leukosyytit .....	13
	4.3 Lisäaineiden vaikutus leukosyyttien säilymiseen .....	14
	4.4 Yhteenveto .....	16
5	TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS.....	18
6	TUTKIMUSMENETELMÄ JA TUTKIMUKSEN SUORITUS .....	19
	6.1 Käytännön toteutus .....	19
	6.1.1 Näytteiden laimentaminen .....	20
	6.1.2 Näytteiden värjääminen .....	21
7	TULOKSET .....	22
	7.1 Erytrosyytit .....	22
	7.2 Leukosyytit .....	24
	7.3 Tulosten tulkinta .....	26
	7.3.1 Erytrosyytit.....	26
	7.3.2 Leukosyytit.....	26
	7.3.3 Yhteenveto .....	27
	7.4 Luotettavuus.....	27
8	POHDINTA.....	29
	LÄHTEET.....	32
	LIITTEET .....	34
	Liite 1. Näytteiden erytrosyyttien lukumäärä x10 <sup>6</sup> /l aikapisteittäin.....	34
	Liite 2. Näytteiden leukosyyttien lukumäärä x 10 <sup>6</sup> /l aikapisteittäin .....	35

## 1 JOHDANTO

Likvor eli aivo-selkäydinneste ympäröi aivoja ja selkäydintä. Likvor suojaa keskushermostoa iskulta ja toimii puskurina kallonsisäisten rakenteiden muuttuessa. Likvor muodostuu suodattamalla verestä ja sen koostumus eroaa plasmasta muun muassa glukoosin ja aminohappojen pitoisuuksien osalta. Normaalisti likvorissa ei ole soluja. Aikuisella likvoria on noin 150 ml ja sitä muodostuu vuorokaudessa noin 500 ml. (Sand, Sjaastad, Haug & Bjålie 2011, 115–117.)

Likvorista otetaan näyte lumbaalipunktiolla laboratoriotutkimuksia varten. Indikaatioita näytteenotolle ovat epäily keskushermoston tulehduksellisesta sairaudesta (esimerkiksi MS-tauti), infektiosta tai verenvuodosta. Näytteestä voidaan tutkia erilaisia analyyttejä, kuten glukoosia ja proteiineja, sekä laskea erytrosyytit ja leukosyytit. Solujen laskenta suoritetaan mikroskoopilla kammiolaskentana Bürkerin kammiossa. Näyte on tutkittava mahdollisimman pian laboratorioon saapumisen jälkeen, koska solut hajoavat nopeasti. Leukosyyttien lisääntynyt määrä viittaa infektiin tai tulehdukselliseen sairauteen. Erytrosyytit ovat merkki vuodosta lukinkalvon onteloon tai näytteenotosta johtuvaa artefaktaa. (Soinila & Launes 2011, 79–84.)

Opinnäytetyön toimeksiantaja on Fimlab Laboratoriot Oy. Opinnäytetyön tarkoitus on tutkia likvornäytteen solujen säilyvyyttä. Solut laskettiin välittömästi, 1 tunnin, 2 tunnin, 4 tunnin ja 24 tunnin kuluttua näytteen laboratorioon saapumisesta. Lasketuista tuloksista selvitettiin erytrosyytti- ja leukosyyttimäärien muutos verrattuna alkuperäisiin solumääriin. Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa uutta ja ajantasaista tietoa likvornäytteen solujen säilymisestä Fimlab Laboratoriot Oy:lle.

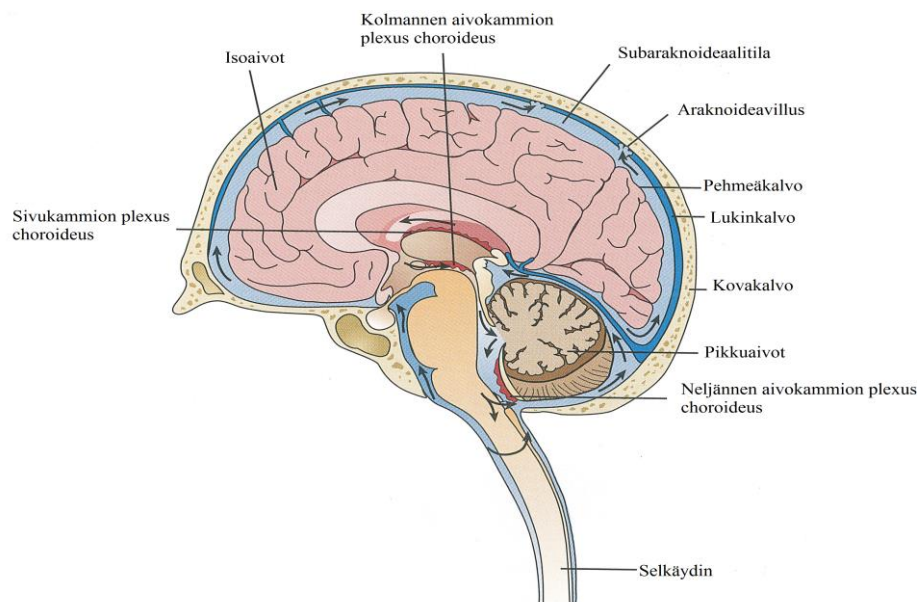
Tutkimuksen kokeellinen osuus tehtiin Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen toimipisteen hematologian laboratoriossa huhtikuussa 2015 ja tutkimusmateriaalina käytettiin laboratorioon saapuneita likvornäytteitä. Opinnäytetyön kokeellinen osuus kesti viikon. Likvornäytteen soluista tai niiden tutkimisesta on tehty aikaisempia opinnäytetöitä, esimerkiksi vuonna 2011 Turun ammattikorkeakoulussa (”Likvorin leukosyyttien mikroskooppisen erittelylaskennan tulosten vertailu Tykslabissa” Eskola, J. 2011) ja samana vuonna 2011 Tampereen ammattikorkeakoulussa (”Kammiossa laskettavien punktionesteistä tehtävien solututkimusten tulosten vertailu Sysmex XE-5000-

analyssaattorilla saatuihin tuloksiin” Paananen, A. & Puustinen, K. 2011). Likvorin solujen säilyvyyttä koskevia opinnäytetöitä ei kuitenkaan löytynyt.

## 2 LIKVOR

Aivoja ja selkäydintä ympäröi kolme sidekudoskalvoa. Uloin kalvo on paksu ja jäykkä kovakalvo (dura mater), joka on kiinni kallon sisäpinnassa. Kovakalvon alla on lukinkalvo (araknoidea). Sisin kalvo on pehmeäkalvo (pia mater), joka myötäilee aivojen ja selkäytimen pintaa. Lukinkalvon ja pehmeäkalvon välissä on lukinkalvonontelo eli subaraknoidealitila, joka on likvorin täyttämä. (Sand ym. 2011, 115.) Likvor suojaa keskushermostoa ja toimii tehokkaana iskunvaimentimena. Aivot sijaitsevat jäykän kallon sisällä, joten likvor toimii laajenemispuskurina kallonsisäisten rakenteiden tilavuuden muuttuessa ja estää aivopaineen liiallisen kohoamisen. (Soinila 2011, 42.) Likvor myös kuljettaa ravinteita ja kuona-aineita. (Brunzel 2004, 326).

Suurin osa likvorista muodostuu suodattamalla verestä aivokammioiden plexus choroideuksista eli suonipunoksista aivokammioihin. Osa likvorista on peräisin aivojen soluvälinesteestä. (Pirttilä & Oksi 2001, 1621.) Aivokammioista likvor virtaa selkäytimen keskuskanavaan ja lukinkalvononteloon (Sand ym. 2011, 115–117), ja poistuu lopulta takaisin verenkiertoon araknoideavillusten kautta (Pirttilä & Oksi 2001, 1621). Aikuisella likvoria on normaalisti noin 150 ml ja sitä muodostuu vuorokaudessa noin 500 ml. (Soinila 2011, 42). Vastasyntyneellä likvorin tilavuus vaihtelee 10 ml ja 60 ml välillä. (Brunzel 2004, 326). Likvorkierron estyessä likvorin tilavuus suurenee ja aivopaine kohoaa. Tätä kutsutaan hydrokefalukseksi. (Soinila 2011, 42). Likvorin kierto on esitetty kuvassa 1.



KUVA 1. Likvorin kierto (mukaillen Strasinger & Di Lorenzo 2014)

Likvorin suodattuminen verestä plexus choroidusten verisuonien ja aivokammioita verhoavan solukon, ependyymien, läpi on aktiivinen prosessi ja muuttaa seerumin koostumusta. (Soinila 2011, 41–42). Esimerkiksi likvorin natrium-, kloridi- ja magnesiumkonsentraatiot ovat korkeampia ja kalium- ja kalsiumkonsentraatiot pienempiä kuin seerumissa (Brunzel 2004, 326). Proteiineja likvorissa on huomattavasti vähemmän ja glukoosia hieman vähemmän kuin seerumissa (Soinila & Launes 2011, 82).



### 3 LIKVORIN SOLUJEN LABORATORIODIAGNOSTIIKKA

Terveellä henkilöllä likvorin koostumus on tarkoin säädelty. Muutokset kemiallisten analyttien pitoisuuksissa ja solujen määrässä voivat auttaa sairauden diagnosoinnissa. Rutiinidiagnostiikassa likvorista mitataan proteiini-, glukoosi- ja laktaattipitoisuudet, tutkitaan mikrobien esiintymistä viljelyllä ja immunologisilla menetelmillä sekä lasketaan solut mikroskoopissa. (Brunzel 2004, 327.) Koska osa likvorista muodostuu aivojen soluvälinesteestä, voidaan likvorista selvittää aivojen toiminnan muutoksia (Pirttilä & Oksi 2001, 1621).

#### 3.1 Likvornäytteen indikaatiot ja näytteenotto

Kehittyneet kuvantamismenetelmät ovat jonkin verran syrjäyttäneet likvornäytteen tutkimista neurologisessa diagnostiikassa. Indikaatioita likvornäytteenotolle ja solujen tutkimiselle ovat epäily infektiosta (meningiitti, enkefaliitti), tulehduksellisesta sairaudesta (MS-tauti, sarkoidoosi) tai verenvuodosta. (Soinila & Launes 2011, 79.)

Lääkäri ottaa likvornäytteen punktoimalla selkäydinkanavasta, tavallisesti lumbaalipunktiolla eli lannepistolla (Tuokko, Rautjoki & Lehto 2008, 82). Näyte voidaan erikoistapauksissa ottaa myös niska- eli okkipitaalipunktiolla tai aivokammionpunktiolla leikkauksen yhteydessä. Näytteenottopaikka vaikuttaa näytteen solumäärään. Likvorissa voi olla soluja lumbaalialueella kaksin- tai kolminkertainen määrä aivokammioihin verrattuna. (Taskinen 1994, 319.)

Vasta-aiheita lumbaalipunktiolle ovat pistokohdan ihon tulehdus, kohonnut kallonsisäinen paine (Soinila & Launes 2011, 79) ja antikoagulanttihoito (Pitkänen & Försten, 2014). Punktion aikana potilas on tavallisesti kylkiasennossa tutkimuspöydällä polvet koukussa ja selkä köyryssä, jotta nikamien okahaarakkeiden välit avautuvat. Ennen punktiota pistokohdan iho puhdistetaan klooriheksidiinisprillä. Iho voidaan myös puuduttaa, mutta se ei ole välttämätöntä. Pistokohta on yleensä kolmannen ja neljännen lannenikaman väli. (Soinila & Launes 2011, 79–80.) Likvoria tiputetaan neulasta steriileihin näyteputkiin ja viljelymaljoille. Solut lasketaan kolmannesta putkesta, jotta

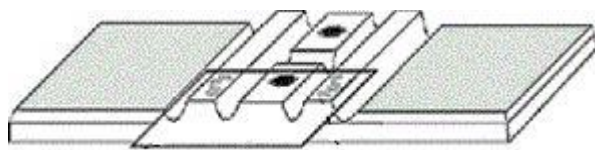
näytteessä olisi vain selkäydinkanavasta peräisin olevia erytrosyyttejä näytteenotosta johtuvan artefaktaveren sijaan (Tuokko ym. 2008, 82–83).

Yleisin lumbaalipunktion aiheuttama komplikaatio on pystyasennossa paheneva päänsärky, jonka syynä on likvorin vuoto pistokohdasta ja tästä aiheutuva paineen lasku. Pahimmillaan vuoto voi johtaa kallonsisäiseen hypotensioon ja aivovammaan. Vuotoa voidaan estää tekemällä veripaikka. (Pitkänen & Försten 2014.) Tällöin selkäydinkanavaan pistetään potilaan omaa verta, joka muodostaa paikan vuotokohtaan (Soinila & Launes 2011, 81). Muita mahdollisia, mutta harvinaisia komplikaatioita ovat hermovaurio, infektio tai verenvuoto epiduraali- tai spinaalitalaan. (Pitkänen & Försten 2014).

### 3.2 Solujen kammiolaskenta

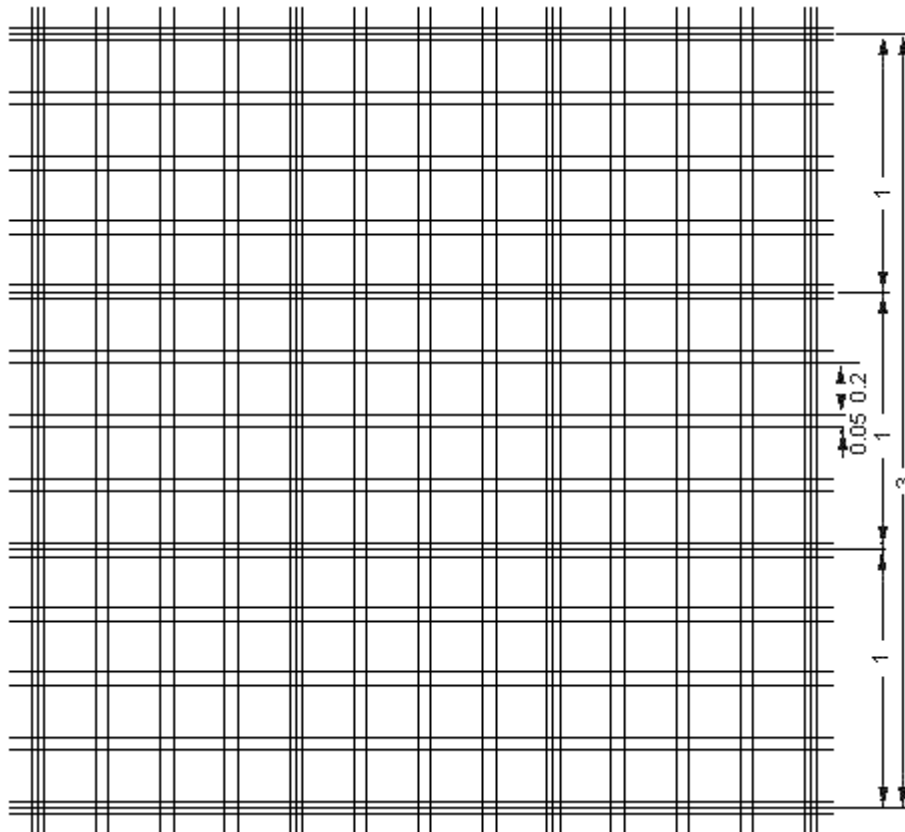
Kammiolaskennalla voidaan laskukammion ja mikroskoopin avulla määrittää solupitoisuus elimistön eri nesteistä. Menetelmää on yleensä käytetty punktionesteiden kuten likvorin, pleuranesteen ja nivelnesteen solujen laskemiseen, koska näiden näytteiden solujen määrä on usein liian pieni koneelliseen määrittämiseen eivätkä tulokset ole olleet luotettavia. Nykyisin punktionesteiden solulaskentaan on tarjolla myös automaattisia solulaskenta-analysaattoreita. (Savolainen 2010, 71; Vilpo 1998, 93.)

Laskukammioita on erilaisia, mutta niiden kaikkien periaate on sama. Laskukammio koostuu kammioista ja peitinlasista. Kammio täytetään peitinlasin reunasta tutkittavalla näytteellä niin, ettei sinne pääse ilmakuplia eikä se ylitäydy. (LO-laboroptik 2015.) Solujen annetaan laskeutua kammion pohjalle noin yhden minuutin ajan ennen mikroskopointia (Brunzel 2004, 330). Kuvassa 2 on Fimlab Laboratoriot Oy:ssä käytetty Bürkerin laskukammio (Fimlab Laboratoriot Oy 2014).



KUVA 2. Bürkerin laskukammio (mukaillen LO-laboroptik)

Kammion pohjaan on kaiverrettu laskentaruudukko (LO-laboroptik 2015). Solut lasketaan ruudukon tietyltä alueelta, jonka pinta-ala tiedetään tarkasti. Koska myös kammion korkeus on tunnettu, saadaan tietää solumäärä määrättyssä tilavuudessa. Tästä voidaan laskea solupitoisuus näytteessä. (Vilpo 1998, 93.) Kuvassa 3 on esitetty Bürkerin kammion laskentaruudukko. Koko ruudukko on kooltaan 3 mm x 3 mm ja se koostuu yhdeksästä pienemmästä, 1 mm x 1 mm kokoisesta ruudusta. Kammion syvyys on 0,1 mm. (LO-laboroptik 2015.)



KUVA 3. Bürkerin kammion laskentaruudukko (LO-Laboroptik)

Runsassoluiset näytteet voidaan laimentaa 0,9 % keittosuolaliuoksella laskemisen helpottamiseksi (Brunzel 2004, 330). Mikäli leukosyyttejä on yli  $20 \times 10^6/l$ , tehdään leukosyytien erittelylaskenta (Tuokko ym. 2008, 84). Näyte värjätään väriliuoksella, esimerkiksi Samsonin väriliuoksella, joka tuhoaa erytrosyytit ja värjää leukosyytit. Tämän jälkeen leukosyytit lasketaan kammiossa. Leukosyytit jaetaan polymorfonukleaarisiin (neutrofiilit ja eosinofiilit) sekä mononukleaarisiin (monosyytit ja lymfosyytit) leukosyytteihin. (Fimlab Laboratoriot Oy 2014.)

### 3.3 Solulöydösten kliininen merkitys

Tavallisesti likvor on kirkasta ja vesimäistä. Näytteen samea väri voi indikoida korkeaa solupitoisuutta. Likvornäytteen solut ovat verisoluja eli erytrosyyttejä tai leukosyyttejä. Normaalisti näytteessä on hyvin vähän soluja, erytrosyyttejä  $0-2 \times 10^6/l$  ja leukosyyttejä  $0-5 \times 10^6/l$ . Vastasyntyneellä leukosyyttejä voi olla jopa  $30 \times 10^6/l$ . (Brunzel 2004, 330.) Näytteessä olevat muutamat leukosyytit ovat yleensä lymfosyyttejä. Erytrosyytit ovat merkki hiljattain tapahtuneesta verenvuodosta lukinkalvononteloon (subaraknoidaalivuoto, SAV) tai näytteenoton yhteydessä tullutta artefaktia. Artefaktaveren ollessa kyseessä verisolujen määrä on yleensä suurin ensimmäisessä näyteputkessa ja vähenee peräkkäisissä putkissa. Artefaktaveri voi myös näkyä veriviiruna näytettä otettaessa. Likvorin keltainen väri voi viitata päiviä tai viikkoja sitten tapahtuneeseen vuotoon. (Soinila & Launes 2011, 81–82.)

Runsasta leukosyyttien määrää kutsutaan pleosytoosiksi ja se voi olla merkki useista neurologisista sairauksista. Usein pleosytoosi viittaa tulehdukseen. Runsa leukosyyttien määrä (yli  $1000 \times 10^6/l$ ) johtuu yleensä bakteeri-infektiosta, kuten bakteerin aiheuttamasta meningiitistä. Alle  $1000 \times 10^6/l$  leukosyyttipitoisuus viittaa virusinfektioon tai muuhun tulehdukselliseen sairauteen, kuten MS-tautiin. (Soinila & Launes 2011, 82.) Pientä pleosytoosia ( $10-30 \times 10^6/l$ ) voi esiintyä tuberkuloosi- ja sienimeningiitin, keskushermoston syfiliksen ja herpesin aiheuttaman enkefaliitin yhteydessä (Steele ym. 1986).

Myös leukosyyttien erottelu on tärkeää tulosten tulkinnan kannalta. Granulosyytit liittyvät usein bakteerimeningiittiin, mutta myös varhaiseen virus-, tuberkuloosi-sienimeningiittiin. Toistuvat lumbaalipunktiot voivat aiheuttaa aivokalvojen ärsytystä ja siten granulosyyttien esiintymistä likvornäytteessä. Lymfosyytit johtuvat usein muun mikrobin kuin bakteerin aiheuttamasta meningiitistä, MS-taudista tai Guillain-Barrén syndroomasta. (Brunzel 2004, 351.)

## 4 LIKVORIN SOLUJEN SÄILYMINEN

Likvorin solujen säilyvyyttä on tutkittu useissa, muun muassa Tourtellotten ym. (1958), Chow'n ym. (1984), Steelen ym. (1986), Duxin ym. (1994) sekä De Graafin ym. (2011) tutkimuksissa. Tourtellotten ym. (1958) ja Chow'n ym. (1984) tutkimuksia lukuun ottamatta tarkastellut tutkimukset ovat keskittyneet leukosyyttien säilymiseen.

### 4.1 Erytrosyytit

Tourtellotten ym. (1958) mukaan erytrosyyteissä ei tapahdu merkittävää hajoamista 24 tunnin säilytyksen aikana huoneenlämmössä (22- 25 °C) tai 4 °C lämpötilassa säilytetyinä. Tämä vahvistivat Chow ja Schmidley (1984). Heidän tutkimuksessaan havaittiin, ettei likvorin erytrosyyteissä tapahdu merkittävää hajoamista 24 tunnin säilytyksen jälkeen huoneenlämmössä (22 °C) eikä jääkaapissa (4 °C) säilytetyissä näytteissä. Erytrosyyteistä oli 24 tunnin säilytyksen jälkeen jäljellä 90 % kummassakin säilytyslämpötilassa. (Chow & Schmidley 1984.)

### 4.2 Leukosyytit

Likvorin hypotonisuuden vuoksi sen sisältämät leukosyytit hajoavat nopeasti. Hypotonisuuden lisäksi leukosyyttien hajoamiseen vaikuttavat likvorin matala proteiini- ja lipidikonsentraatio, sillä proteiinit ja lipidit stabilisoivat leukosyyttien solukalvoja. (Steele ym. 1986.) Toisaalta Chow'n ja Schmidleyn 1984 julkaistussa tutkimuksessa ei havaittu yhteyttä valkosolujen hajoamisnopeuden ja likvorin glukoosi- tai proteiinkonsentraation välillä (Chow & Schmidley 1984).

Chow'n ja Schmidleyn (1984) tutkimuksessa soluja sisältämättömään likvoriin lisättiin homologista verta ja tutkittiin verisolujen säilymistä likvorissa eri aikapisteissä huoneenlämmössä (22 °C) sekä jääkaappilämpötilassa (4 °C). Kahden tunnin säilytyksen aikana 40 % leukosyyteistä havaittiin hajoaneen huoneenlämmössä. Kylmässä säilytettyjen näytteiden soluista oli hajonnut 15 % vastaavan kahden tunnin säilytyksen aikana. Viiden tunnin säilytyksen jälkeen huoneenlämpöisten näytteiden leukosyyteistä oli hajonnut 53

%, jääkaapissa säilytettyjen näytteiden leukosyyteistä 31 %. Tutkimuksessa todettiin, että leukosyytit hajoavat nopeasti huoneenlämmössä säilytettäessä ja että niiden hajoamista voidaan hidastaa, mutta ei pysäyttää, säilyttämällä näytteitä jääkaapissa. (Chow & Schmidley 1984.)

Steelen ym. (1986) tekemän tutkimuksen mukaan likvorin soluista kaikkein nopeimmin laski neutrofiilien määrä. Tutkimuksessa tunnin säilytyksen jälkeen jäljellä oli 68 % (virhemarginaali  $\pm 10$  %) alkuperäisen näytteen neutrofiileistä, kahden tunnin säilytyksen jälkeen enää 50 % (virhemarginaali  $\pm 12$  %). Likvorin lymfosyyttien ja monosyyttien lukumäärässä ei tapahtunut merkittäviä muutoksia tunnin tai kahden tunnin säilytyksen aikana, vaan niiden lukumäärä muuttui merkittävästi vasta kolmessa tunnissa. (Steele ym. 1986.)

### **4.3 Lisäaineiden vaikutus leukosyyttien säilymiseen**

Likvorin solujen säilymistä on tutkittu myös lisäämällä näytteisiin erilaisia lisäaineita tai puskureita. (Dux ym. 1994; de Graaf 2011; Veerman ym 1985). Lisäksi on tutkittu Trans-Fix-erityisputkissa säilyttämisen vaikutusta likvorin solujen säilymiseen (de Jongste 2014).

Saksalaisessa tutkimuksessa käsittelemättömien likvornäytteiden lymfosyyttimäärä laski 65 prosenttiin alkuperäisestä lymfosyyttimäärästä 90 minuuttia näytteenoton jälkeen. FC-puskurilla käsitellyissä likvoreissa 90 % lymfosyyteistä oli jäljellä 90 minuuttia näytteenotosta. Tutkimuksen mukaan monosyytit ja granulosyytit hajoavat lymfosyyttejä nopeammin, sillä 90 minuutin säilytyksen jälkeen käsittelemättömien likvornäytteiden monosyyteistä ja granulosyyteistä oli tuhoutunut 90 prosenttia. Likvorin lymfosyyttien todettiin säilyvän FC- puskurilla puskuroiduissa likvornäytteissä paremmin kuin käsittelemättömissä likvornäytteissä. Tutkimuksessa ei mainittu näytteiden säilytyslämpötilaa. (Dux ym. 1994.)

De Graafin ym. (2011) tekemässä tutkimuksessa todettiin, että likvornäytteissä, joihin oli lisätty lisäainetta, ei havaittu tunnin ja viiden tunnin säilytyksen jälkeen solujen hajoamista. Ainoa poikkeus olivat granulosyytit tunnin säilytyksen jälkeen. Lisäaineettomissa

likvoreissa noin puolet leukosyyteistä oli hajonnut tunnin säilytyksen aikana. Likvornäytteissä, joihin ei ollut lisätty lisäainetta, leukosyyttien lukumäärä osoittautui kaikissa aikapisteissä pienemmäksi kuin lisäaineellisissa näytteissä. Viiden tunnin säilytyksen jälkeen lisäaineettomien näytteiden lymfosyyteistä oli jäljellä enää 56 %. Monosyyttien määrä oli laskenut vielä enemmän, sillä viiden tunnin säilytyksen jälkeen niistä oli jäljellä enää 34 %. Solujen hajoaminen lisäaineettomissa likvoreissa oli suurinta ensimmäisen tunnin aikana. (de Graaf ym. 2011.)

Tutkimuksessa, jossa huoneenlämmössä säilytettyihin likvornäytteisiin lisättiin Earlen suolaliuoksesta sekä 20-prosenttisesta ihmisen seerumin albumiinista 1:2 valmistettua lisäainetta, todettiin lymfosyyttien säilyvän huomattavasti paremmin kuin ilman elatusainetta. Lisäaineen todettiin sopivan jopa 24 tunnin mittaiseen likvornäytteiden säilyttämiseen. (Veerman, Huismans & Zantwijk 1985.)

Alankomaalaisessa tutkimuksessa todettiin RPMI-1640:stä, HEPES:stä, L-glutamiinista, 2 % penisilliinistä/streptomysiinistä, 5 % naudan sikiön seerumista (FBS) sekä hepariinista koostuvan lisäaineen lisäämisen likvoriin ehkäisevän solujen tuhoutumista ja mahdollistavan likvornäytteen pidemmän säilytysajan. Seerumia sisältävän lisäaineen lisäys heti näytteenoton jälkeen säilytti likvornäytteen solut ainakin viisi tuntia näytteenotosta. Vaikutuksen arveltiin perustuvan seerumia sisältävän lisäaineen likvoria puskuroivaan vaikutukseen. (de Graaf ym. 2011.)

Vuonna 2014 julkaistussa alankomaalaisessa tutkimuksessa todettiin, että puoli tuntia näytteenoton jälkeen leukosyyttien mediaanilukumäärä TransFix-putkissa oli sama kuin lisäaineellisissa vertailunäytteissä, mutta 1,4 kertaa korkeampi kuin käsittelemättömissä likvornäytteissä. 18 tunnin säilytyksen jälkeen leukosyyttien mediaanilukumäärä Transfix- säilytysputkissa säilytetyissä likvoreissa oli 1,8 kertaa korkeampi kuin lisäaineellisissa likvornäytteissä ja 2,3 kertaa korkeampi kuin käsittelemättömissä likvoreissa. Erot johtuivat enimmäkseen lymfosyyteistä. 18 tunnin säilytyksen jälkeen monosyyttien määrä Transfix- putkissa säilytetyissä likvornäytteissä oli samankaltainen kuin lisäaineellisissa likvornäytteissä, mutta korkeampi kuin käsittelemättömissä likvoreissa. Granulosyyttien säilymisessä ei sen sijaan havaittu merkittäviä eroja Transfix- putkissa säilytettyjen, lisäaineellisten tai käsittelemättömien likvornäytteiden välillä. (de Jongste ym. 2014.)

Likvornäytteiden leukosyyttien hajoamisen vuoksi solut tulisi laskea viivyttämättä, ettei leukosyyttien määrää aliarvioitaisi solulaskennassa. Mikäli solulaskentaa ei voida tehdä välittömästi, tulisi näyte siirtää jääkaappilämpötilaan. (Chow & Schmidley 1984.)

Neutrofiilien lukumäärän väheneminen 32 prosentilla tunnin säilytyksen jälkeen ja 50 prosentilla kahden tunnin säilytyksen jälkeen alkuperäisestä solukonsentraatiosta viittaa siihen, että likvornäytteiden analysoinnin viivästyessä saattaa esiintyä kliinisiä virheitä. (Steele ym. 1986). De Graafin ym. (2011) suorittamassa tutkimuksessa havaittiin, että kuusi seitsemästä (86 %) lievästi runsassoluisesta ( $5-15 \times 10^6$  leukosyyttiä/l) ja käsittelemättömästä likvornäytteestä määritettiin virheellisesti normosellulaariseksi tunnin säilytyksen jälkeen. Tutkimuksessa todettiin, että likvorin solujen nopean hajoamisen vuoksi lievästi runsassoluiset näytteet voidaan arvioida väärin normaaleiksi riippuen näytteenoton ja likvornäytteen analysoinnin välissä kuluneesta ajasta. (de Graaf ym. 2011.)

#### 4.4 Yhteenveto

Yhteenvetona voidaan todeta, että tarkasteltujen tutkimusten perusteella punasolut säilyvät likvornäytteissä hyvin sekä huoneenlämmössä (22–25 °C) että jääkaappilämpötilassa (4 °C) säilytettyinä. (Tourtellotte ym. 1958; Chow & Schmidley 1984). Leukosyytit säilyvät tutkimustulosten perusteella erytrosyyttejä huonommin (Steele ym. 1986; Chow & Schmidley 1984; Dux ym. 1994; de Graaf ym. 2011; Veerman ym. 1985; de Jongste ym. 2014).

Leukosyyteistä ensimmäisinä hajoavat Steelen ym. (1986) havaintojen mukaan neutrofiilit. Duxin ym. (1994) tutkimustuloksen perusteella monosyytit ja granulosyytit hajoavat lymfosyyttejä nopeammin. Myös de Graafin ym. (2011) tutkimustuloksen mukaan monosyyttien määrä laskee säilytyksen aikana eniten. Toiseksi eniten heidän tutkimuksensa perusteella laskee lymfosyyttien määrä.

Veermanin ym. (1985) tutkimustuloksen perusteella likvorin lymfosyytit säilyvät lisäaineella käsiteltyinä paremmin kuin käsittelemättömissä näytteissä. Samankaltaiseen tulokseen päädytään de Jongsten ym. (2014) tutkimuksessa, jossa todetaan lymfosyyttien ja monosyyttien säilyvyyden paranevan lisäainekäsittelyllä sekä TransFix- putkissa säilyttämällä.



Kaiken kaikkiaan likvorin leukosyytit säilyvät tarkasteltavien tutkimusten mukaan kylmässä paremmin kuin huoneenlämmössä. Lisäaine parantaa likvorin leukosyyttien säilymistä käsittelemättömien likvornäytteiden leukosyytteihin verrattuna. De Jongsten (2014) mukaan kaikkein parhaiten likvorin leukosyytit säilyvät kuitenkin TransFix-putkissa.

## 5 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää miten kauan likvornäytteen solut säilyvät tutkimuskelpoisina eri lämpötiloissa säilytettynä. Tutkittavien likvornäytteiden solut laskettiin eri aikapisteissä: välittömästi niiden laboratorioon saapumisen jälkeen sekä tunnin, kahden tunnin, neljän tunnin ja kahdenkymmenen neljän tunnin kuluttua.

Tavoitteena on tuottaa tietoa likvorin solujen säilymisestä Fimlab Laboratoriot Oy:lle ja tutkia, onko erytrosyyttien ja leukosyyttien säilyvyydessä eroa. Opinnäytetyön perusteella Fimlab Laboratoriot Oy voi pohtia, onko näyte tutkittava kahden tunnin kuluessa ja miettiä tarpeen mukaan työtapojen muokkaamista.

Tutkimusongelma:

Kuinka kauan likvornäyte on tutkimuskelpoinen solujen laskentaan?

## 6 TUTKIMUSMENETELMÄ JA TUTKIMUKSEN SUORITUS

Opinnäytetyömme on menetelmältään kvantitatiivinen, sillä työssä seurataan likvorin erytrosyyttien ja leukosyyttien määrän mahdollista muuttumista eri ajanjaksoina. Näitä muutoksia voidaan laskea matemaattisesti ja niiden perusteella tehdä päätelmiä likvorin säilyvyydestä.

Kvantitatiivista tutkimusta, jota kutsutaan myös eksperimentaaliseksi, hypoteettis-deduktiiviseksi sekä positivistiseksi tutkimukseksi, käytetään paljon yhteiskunta- ja sosiaalitieteissä. Tutkimustapa juontaa juurensa luonnontieteistä, minkä vuoksi useat tutkimukselliset menettelytavat ovat näillä tieteenaloilla samankaltaisia. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa keskeisiä elementtejä ovat aikaisemmat teoriat, johtopäätökset aikaisemmin tehdystä tutkimuksesta, aineiston keruun tai koejärjestelyjen suunnitelmat, hypoteesien esittäminen, taulukon tai taulukoiden tekeminen muuttujista sekä aineiston saattaminen tilastollisesti käsiteltävään muotoon. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tehdään päätelmiä perustuen havaintoaineiston tilastolliseen analysointiin, esimerkiksi kuvailemalla tuloksia prosenttitaulukon avulla ja testaamalla tulosten merkitsevyyttä tilastollisesti. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2015, 139–140.)

### 6.1 Käytännön toteutus

Solujen laskeminen toteutettiin 13.–18.4.2015 Tampereella Fimlab Laboratoriot Oy:n hematologian laboratorioon kuuluvassa eritelaboratoriossa. Opinnäytetyön molempien tekijöiden ollessa paikalla tutkittavat solut laskettiin eri aikapisteissä kummankin tekijän toimesta samasta kammiosta. Solulaskennalle saatiin siis tällöin rinnakkaiset tulokset. Rinnakkaisista tuloksista laskettiin keskiarvot. Aikaisin aamulla ja myöhään iltapäivällä paikalla oli vain toinen opinnäytetyön tekijöistä, jolloin solut laskettiin ainoastaan kerran kussakin aikapisteessä.

Likvorin solujen kammiolaskenta tehtiin mikroskopoimalla Fimlab Laboratoriot Oy:n laatimien, likvorin solujen kammiolaskentaa käsittelevien työohjeiden mukaan. Tutkittavaa näytettä otettiin puhtaaseen kapillaariputkeen ja siirrettiin sillä kertakäyttöiseen Bür-

kerin kammioon, jonka avulla solulaskenta tapahtui. Näytteistä laskettiin erikseen erytrosyytit ja leukosyytit mekaanista solulaskijaa apuna käyttäen. Solulaskennassa mukaan laskettaviksi soluiksi hyväksyttiin johdonmukaisesti ainoastaan ehjät solut, jotka eivät olleet vielä hajoamistilassa. Solut laskettiin heti saapumisen jälkeen sekä yhden, kahden, neljän ja kahdenkymmenen neljän tunnin säilytyksen jälkeen. Näytteitä oli viisitoista, joista neljä saapui kylmäkuljetuksena Tampereen yliopistollisen sairaalan teho-osastolta ja säilytettiin jääkaappilämpötilassa. Yksitoista näytettä saapui huoneenlämpöisenä Tampereen yliopistollisen sairaalan muilta osastoilta ja säilytettiin huoneenlämmössä. Opin- näytetyösuunnitelmasta poiketen huoneenlämpöisiä näytteitä ei laitettu jääkaappiin neljän tunnin säilytyksen jälkeen.

Tutkimuksessa laskettiin kymmenestä (kammion koko toinen puoli + yksi A-ruutu uudelleen) Bürkerin kammion A-ruudusta likvornäytteen erytrosyyttimäärä ja sen jälkeen vastaavasti kymmenen A-ruudun sisältämä leukosyyttimäärä. Näytteiden lopulliset solumäärät laskettiin Fimlab Laboratoriot Oy:n työohjeen laskukaavalla:

$$\frac{N}{10 \times 0,1 \times 10^{-6}/l} = N \times 10^6/l$$

missä  $N$  on kymmenestä A-ruudusta laskettujen solujen määrä.

### 6.1.1 Näytteiden laimentaminen

Osa näytteistä oli näkyvästi niin verisiä, että näytteitä laimennettiin koeputkessa 1:10 solujen laskemisen helpottamiseksi. Tällöin yksi osa näytettä laimennettiin yhdeksällä osalla 0,9-prosenttista NaCl-liuosta. Laimennettavaa näytettä otettiin 50 mikrolitraa ja laimennettiin se 450 mikrolitralla natriumkloridiliuosta, määrällisesti niukkaa näytettä (näyte 12) otettiin kuitenkin vain 20 mikrolitraa ja laimennettiin 180 mikrolitralla NaCl-liuosta. Laimennettuja näytteitä sekoitettiin koeputkisekoittajassa noin viiden minuutin ajan ennen mikroskopointia.

Laimennoksista laskettiin vain erytrosyytit. Leukosyyttien laskemista varten alkuperäinen näyte värjättiin. Bürkerin kammiosta laskettujen erytrosyyttien määrä kerrottiin laimennuskertoimella kymmenen ennen lopullisen tuloksen laskemista, jotta saatiin selville

laimentamattoman näytteen sisältämien erytrosyyttien lukumäärä. Laimentamattoman näytteen solumäärästä laskettiin lopullinen tulos työohjeessa olevan laskukaavan mukaan.

### **6.1.2 Näytteiden värjääminen**

Näytteistä tehtiin värjäys leukosyyttien mikroskopoimiseksi. Värjäys tehtiin Samsonin liuoksella, jota lisättiin yksi osa kolmeen osaan näytettä. Tällöin laimennuskerroin oli 1,33. Käytännössä näytettä otettiin 150 mikrolitraa ja väriliuosta 50 mikrolitraa. Tämän jälkeen näytettä sekoitettiin koeputkisekoittajassa kahdesta viiteen minuuttia.

Leukosyyttien lukumäärä laskettiin Bürkerin kammion kymmenestä A-ruudusta (toinen puoli kokonaan + yksi A-ruutu uudelleen). Leukosyyttien kammiolaskennasta saatu solujen lukumäärä kerrottiin väriliuoksen laimennuskertoimella 1,33. Tämän jälkeen laskettiin näytteen lopullinen leukosyyttimäärä Fimlab Oy:n työohjeessa olevan laskukaavan mukaan. Värjäyksestä huolimatta leukosyyttejä ei eritelty polymorfonukleaarisiin ja mononukleaarisiin soluihin.

## 7 TULOKSET

### 7.1 Erytrosyytit

Taulukosta 1 nähdään näytteiden erytrosyyttien lukumäärät eri aikapisteissä. Solumäärät ovat keskiarvoja kahden eri laskijan saamista tuloksista. Alkuperäiset tulokset solulaskennasta ja tulosten keskihajonnat ovat liitteessä 1. Eri näytteiden solumäärät vaihtelivat paljon,  $1 \times 10^6$  solusta litrassa  $137000 \times 10^6$  soluun per litra. Näytteen 11 erytrosyyttejä ei ole laskettu 4 h aikapisteen kohdalla. Näytettä 13 ei riittänyt viimeiseen laskukertaan. Huoneenlämmössä säilytetyt näytteet ovat taulukossa punaisella taustalla (näytteet 1–11) ja jääkaapissa olleet sinisellä taustalla (näytteet 12–15).

TAULUKKO 1. Erytrosyyttien lukumäärä  $\times 10^6/l$  aikapisteittäin

Näyte	0 h	1 h	2 h	4 h	24 h
1	5	6	6	6	6
2	916	961	828	594	7
3	53	58	51	51	36
4	7615	7740	6170	7240	1893
5	1	1	1	2	0
6	2	1	3	3	2
7	2905	3337	3310	3430	343
8	189	198	222	224	1
9	14	11	15	9	1
10	270	215	199	262	114
11	7	9	9	-	3
12	130700	140000	101000	100400	87400
13	1	0	0	0	-
14	6070	5980	6430	5740	2546
15	10765	11606	9865	10660	7430

Taulukossa 2 on laskettu erytrosyyttien määrien prosentuaalinen muutos aikapisteittäin lähtötilanteeseen verrattuna. Laskennassa on käytetty tulosten keskiarvoja, jotka on esitetty taulukossa 1.

Erytroosyttimäärien muutoksia tarkasteltaessa havaittiin, että yhden tunnin säilytyksen jälkeen suurimmassa osassa näytteitä laskettujen solujen lukumäärä nousi, lukuun ottamatta näytteitä 6, 9, 10, 13 ja 14. Näytteessä 5 oli alun perin vain yksi erytroosytti, joka ei hävinnyt tunnin säilytyksen aikana. Kahden tunnin säilytyksen jälkeen laskettu solumäärä oli laskenut kuudessa näytteessä (näytteet 2, 3, 4, 10, 12 ja 13). Neljän tunnin säilytyksen jälkeen solumäärä oli laskenut yhdeksässä näytteessä (näytteet 2, 3, 4, 9, 10, 12, 13, 14 ja 15). Kahdenkymmenen neljän tunnin säilytyksen jälkeen lähes kaikkien näytteiden, paitsi näytteiden 1, 6 ja 13, erytroosyttimäärä on pienentynyt vähintään 32 %. Näyte 13 loppui kesken, joten tulosta 24 tunnin aikapisteen kohdalta ei saatu.

TAULUKKO 2. Erytroosyttien lukumäärän muutos prosentteina lähtöarvoon verrattuna

Näyte	1h	2h	4h	24h
1	20 %	20 %	20 %	20 %
2	4,9 %	-9,6 %	-35 %	-99 %
3	9,4 %	-3,7 %	-3,7 %	-32 %
4	16 %	-19 %	-4,9 %	-75 %
5	0 %	0 %	100 %	-100 %
6	-50 %	50 %	50 %	0 %
7	15 %	14 %	18 %	-88 %
8	4,7 %	17 %	19 %	-99 %
9	-21 %	29 %	-38 %	-93 %
10	-20 %	-26 %	-3 %	-57 %
11	29 %	29 %	-	-42 %
12	7,1 %	-23 %	-23 %	-33 %
13	-100 %	-100 %	-100 %	-
14	-1,4 %	5,9 %	-5,4 %	-58 %
15	2,7 %	8,40 %	-1 %	-31 %

## 7.2 Leukosyytit

Leukosyyttien määrät aikapisteittäin ovat taulukossa 3. Tulokset ovat keskiarvoja molempien laskijoiden saamista tuloksista. Alkuperäiset tulokset sekä keskihajonnat ovat liitteessä 2. Viidestätoista näytteestä kolmessa ei ollut leukosyyttejä tutkimuksen alussa. Leukosyyttien määrät olivat pienempiä kuin erytrosyyttien määrät ja niissä oli vähemmän vaihtelua näytteiden välillä (vaihteluväli 1-177 x 10<sup>6</sup>/l). Suurimmassa osassa näytteitä leukosyyttejä oli alle 10. Huoneenlämmössä säilytetyt näytteet ovat taulukossa punaisella taustalla (näytteet 1–11) ja jääkaapissa olleet sinisellä taustalla (näytteet 12–15).

TAULUKKO 3. Leukosyyttien lukumäärä x 10<sup>6</sup>/l aikapisteittäin

Näyte	0 h	1 h	2 h	4 h	24 h
1	1	0	0	0	1
2	1	1	0	0	1
3	1	1	0	0	2
4	2	0	0	0	0
5	3	8	3	2	1
6	27	19	24	21	3
7	8	8	3	0	0
8	1	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	1	0	1	2
11	0	0	0	-	0
12	177	164	122	65	0
13	2	1	0	1	-
14	23	16	28	23	17
15	193	212	210	208	81

Taulukossa 4 on laskettu leukosyyttien määrän prosentuaalinen muutos aikapisteittäin lähtötilanteeseen verrattuna. Laskennassa on käytetty tulosten keskiarvoja, jotka on esitetty taulukossa 3.

Yhden tunnin säilytyksen jälkeen kaikkien muiden näytteiden, paitsi näytteiden 5 ja 15, leukosyyttimäärä pieneni tai pysyi ennallaan. Kahden tunnin säilytyksen jälkeen leukosyyttimäärä oli pienentynyt muiden paitsi näytteiden 5, 14 ja 15 osalta. Neljän tunnin



säilytyksen jälkeen leukosyyttimäärä laski kaikissa näytteissä, paitsi näytteissä 14 ja 15. Kahdenkymmenneljän tunnin säilytyksen jälkeen kaikkien näytteiden leukosyyttien määrä oli pysynyt samana tai pienentynyt. Näyte 13 loppui kesken, joten tulosta 24 tunnin aikapisteen kohdalta ei saatu.

TAULUKKO 4. Leukosyyttien lukumäärän muutos prosentteina lähtöarvoon verrattuna

Näyte	1 h	2 h	4 h	24 h
1	-100 %	-100 %	-100 %	0 %
2	0 %	-100 %	-100 %	0 %
3	0 %	-100 %	-100 %	100 %
4	-100 %	-100 %	-100 %	-100 %
5	167 %	33 %	-33 %	-67 %
6	-42 %	-11 %	-22 %	-89 %
7	0 %	-63 %	-100 %	-100 %
8	0 %	-100 %	-100 %	-100 %
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-7,3 %	-31 %	-63%	-100 %
13	-50 %	-100 %	-50 %	-
14	-30 %	22 %	0 %	-26 %
15	9,8 %	8,8 %	7,8 %	-58 %

## 7.3 Tulosten tulkinta

### 7.3.1 Erytrosyytit

Solumäärien muuttuminen näytteissä oli epätasaista. Joissakin näytteissä (esimerkiksi näyte 14) laskettujen solujen lukumäärä laski tunnin säilytyksen aikana, mutta nousi kahden tunnin säilytyksen jälkeen. Koska näytteisiin ei voinut tulla lisää soluja säilytyksen aikana, täytyy laskettujen solujen lukumäärän nousun johtua muista tekijöistä. Mahdollisia virhelähteitä käsitellään luvussa 7.4. Suurimmat muutokset solumäärissä tapahtuivat neljän tunnin ja kahdenkymmenen neljän tunnin välillä. Kahdenkymmenen neljän tunnin säilytyksen aikana suurin osa näytteiden erytrosyyteistä oli hajonnut.

Solumäärien suurista keskinäisistä eroista johtuen muutosprosentit eivät ole keskenään vertailukelpoisia. Näytteissä 5, 6 ja 13 on ollut alkupisteessä hyvin vähän soluja, minkä takia yhdenkin solun muutos aiheuttaa ison muutosprosentin. Runsassoluisissa näytteissä, esimerkiksi näytteessä 12, suurikin solujen lukumäärän muutos vaikuttaa prosentuaalisesti pieneltä.

Säilytyslämpötilan vaikutuksesta erytrosyyttien säilyvyyteen on vaikea vetää johtopäätöstä näin pienen näyteotannon perusteella. Vertailtaessa näytteitä 4 ja 14, joiden solumäärät ovat samaa suuruusluokkaa, huomataan, että kahdenkymmenen neljän tunnin säilytyksen aikana solut ovat säilyneet paremmin kylmässä (näyte 14, muutosprosentti -58 %) kuin lämpimässä (näyte 4, muutosprosentti -88 %).

### 7.3.2 Leukosyytit

Myös leukosyyttien määrien muuttuminen näytteissä oli epätasaista. Ainoastaan näytteessä 12 leukosyytit vähenivät tasaisesti 24 tunnin säilytyksen aikana. Muiden näytteiden solumäärät eivät muuttuneet yhtä johdonmukaisesti. Siksi johtopäätöksiä likvornäytteiden leukosyyttien säilyvyydestä on vaikea tehdä tämän tutkimuksen perusteella.

Näytteiden leukosyyttien määrät alkutilanteessa olivat pieniä. Ainoastaan neljässä (näytteet 6, 12, 14 ja 15) tutkitusta viidestätoista näytteestä leukosyyttien määrä oli lähtötilanteessa yli kymmenen. Muutoin näytteissä oli hyvin vähän soluja, minkä vuoksi yhdenkin solun muutos aiheuttaa ison muutosprosentin. Tästä syystä leukosyyttien muutosprosentteja ei voida vertailla luotettavasti keskenään.

Säilytyslämpötilan vaikutuksesta leukosyyttien säilyvyyteen on vaikea tehdä päätelmiä näin pienen näyteotannan perusteella. Vertailtaessa näytteitä 6 ja 14, joiden solumäärät ovat samaa suuruusluokkaa ( $27 \times 10^6/l$  ja  $23 \times 10^6/l$ ), vaikuttaisi siltä, että leukosyytit säilyisivät paremmin kylmässä. Huoneenlämpöisen näytteen (näyte 6) leukosyyteistä oli kahdenkymmenen neljän tunnin säilytyksen jälkeen hajonnut 89 %, kylmän näytteen (näyte 14) leukosyyteistä oli hävinnyt 26 %.

### 7.3.3 Yhteenveto

Tutkimuksen perusteella ei voida tehdä vertailua erytrosyyttien ja leukosyyttien säilyvyyden eroista. Solumäärien muuttuminen ei ollut johdonmukaista ja näyteotos oli niin pieni, ettei sen perusteella voida tehdä luotettavia päätelmiä. Voidaan vain todeta, että kahdenkymmenen neljän tunnin säilytyksen jälkeen sekä erytrosyyttien että leukosyyttien määrät olivat pienentyneet huomattavasti.

## 7.4 Luotettavuus

Tutkimusaineistoa kerättiin viikon ajan, minkä seurauksena tutkimukseen saatiin vain viisitoista näytettä. Joitakin näytteitä jouduttiin hylkäämään solujen puuttumisen ja vähäisen näytemäärän vuoksi. Viidestätoista näytteestä ainoastaan neljä saapui laboratorioon kylmänäytteinä, joten säilytyslämpötilan vaikutuksesta likvorin solujen säilymiseen on vaikea tehdä luotettavaa tulkintaa tämän tutkimuksen perusteella. Tutkimuksen luotettavuutta olisi lisännyt suurempi näyteotos.

Näytekohtaisissa solumäärissä oli paljon keskinäistä vaihtelua, mikä osaltaan hankaloittaa johtopäätösten tekemistä. Niukkasoluisissa näytteissä yhdenkin solun muutos on pro-

sentuaalisesti suuri. Runsassoluisissa näytteissä määrällisesti iso muutos vaikuttaa prosentuaalisesti pieneltä. Mikäli näytteiden solumäärät olisivat lähtötilanteessa olleet samaa suuruusluokkaa, olisivat solumäärien muutokset olleet vertailukelpoisempia keskenään.

Solujen sijoittuminen Bürkerin kammion ruudukkoon on sattumanvaraista, mikä vaikuttaa etenkin niukkasoluisten näytteiden tuloksien luotettavuuteen. Tutkimuksen luotettavuutta olisivat lisänneet näytteistä tehdyt rinnakkaislaskennat eri kammioissa. Tähän ei valitettavasti ollut resursseja. Sen sijaan näytteistä tehtiin kussakin aikapisteessä mahdollisuuksien mukaan rinnakkaiset laskennat samasta kammioista siten, että kumpikin opinäytetyön tekijöistä laski kammiossa olevat solut. Näistä tuloksista laskettiin keskihajonnat.

Laskuvirheet ovat mahdollisia erityisesti runsassoluisten näytteiden laskemisessa. Myös ulkoiset häiriötekijät saattavat vaikeuttaa keskittymistä ja aiheuttaa virheitä. Alkuperäisessä solulaskennoista saadut tulokset olivat kuitenkin yhdenmukaiset Fimlab Laboratoriot Oy:n henkilökunnan saamien tulosten kanssa. Laskuvirheiden esiintymistä pyrittiin ehkäisemään harjoittelemalla solulaskentaa ennen kokeellisen tutkimuksen alkua muutama tunnin ajan Fimlab Laboratoriot Oy:n tiloissa yrityksen henkilökunnan ohjauksessa.

Näytteiden siirrostus kapillaarilla Bürkerin kammioon voi aiheuttaa solumäärien vaihtelua eri laskukerroilla. Lisäksi näytteiden laimentaminen saattaa vaikuttaa tulosten tarkkuuteen. Erityisesti näytteiden puutteellinen sekoittaminen voi lisätä epätarkkuutta, sillä huonosti sekoitettujen näytteiden solut jakautuvat epätasaisesti. Näytteiden huolelliseen sekoittamiseen ennen solulaskentaa on kuitenkin pyritty kiinnittämään huomiota tutkimuksen kokeellisen viikon aikana.

Työmme ohjaajan mukaan leukosyyttien värjäyksellä saattaa olla leukosyyttejä hajottava vaikutus. Tällöin laskettujen leukosyyttien määrä olisi pienempi kuin silloin, jos näyte olisi jätetty värjäämättä. (Valo 2015.)

Koska leukosyyttien erittelylaskentaa ei tehty, näytekohtaiset solujakaumat eivät ole tiedossa. Luvussa 4 tarkasteltujen aikaisempien tutkimusten perusteella likvorin granulositytit sekä lymfosyytit säilyvät kauemmin kuin monosyytit (Dux 1994; de Graaf 2011), joten likvornäytteiden solujakaumat saattavat vaikuttaa tutkimuksesta saatuihin epä johdonmukaisiin tuloksiin.

## 8 POHDINTA

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli tutkia likvornäytteen solujen säilyvyyttä. Tavoitteena oli uuden ja ajantasaisen tiedon tuottaminen Fimlab Laboratoriot Oy:lle. Likvornäytteiden solut laskettiin välittömästi, 1 tunnin, 2 tunnin, 4 tunnin ja 24 tunnin kuluttua näytteen laboratorioon saapumisesta, minkä jälkeen selvitettiin solumäärien muutos verrattuna alkuperäisiin solumääriin. Valitsimme aiheen, koska se vaikutti mielenkiintoiselta ja siinä yhdistyivät kokeellinen tutkimus sekä kiinnostava teoriaosuus.

Saimme opinnäytetyömme aiheen Fimlab Laboratoriot Oy:ltä syksyllä 2014. Kokeellinen osuus suoritettiin yhden viikon aikana huhtikuussa 2015. Tutkimusmateriaalina käytettiin laboratorioon saapuneita likvornäytteitä, joita kertyi viikon aikana 15 kappaletta. Näytteistä yksitoista saapui laboratorioon sekä säilytettiin huoneenlämmössä ja neljä kylmässä. Joitakin näytteitä jouduttiin hylkäämään solujen puuttumisen tai liian pienen näyttemäärän vuoksi. Yksi näytteistä loppui kesken, joten viimeistä laskentaa ei voitu suorittaa.

Emme saaneet tutkimuksestamme yksiselitteistä tulosta. Luvussa 4 käsiteltyjen aikaisempien tutkimusten perusteella oletimme leukosyyttien hajoavan nopeasti (Steele ym.1986; Chow & Schmidley 1984; Dux ym. 1994; de Graaf ym. 2011) ja erytrosyyttien säilyvän hyvin vuorokauden mittaisen säilytyksen ajan (Tourtellotte ym. 1958; Chow & Schmidley 1984). Kolmessa näytteessä laskettujen leukosyyttien lukumäärä kuitenkin nousi yhden tunnin aikapisteen kohdalla. Kahdenkymmenenneljän tunnin säilytyksen jälkeen leukosyyttien määrä oli laskenut selvästi kaikissa näytteissä. Leukosyyttien määrien muutos ei ollut tasaista säilytyksen aikana. Myös laskettujen erytrosyyttien lukumäärä nousi yhdeksässä näytteessä yhden tunnin säilytyksen jälkeen. Kahden tunnin aikapisteen kohdalla erytrosyytit alkoivat käpristyä reunoistaan ja muuttua piparimaisiksi. Kahdenkymmenenneljän tunnin säilytyksen jälkeen erytrosyyttien määrä oli laskenut yhtä näytettä lukuun ottamatta vähintään 31 %.

Emme löytäneet selvää syytä sille, miksi laskettujen solujen lukumäärä joissakin näytteissä nousi säilytyksen aikana. Laskuvirheiden karsimiseksi harjoittelimme solulaskentaa Fimlab Laboratoriot Oy:n henkilökunnan ohjaamina Fimlab Laboratoriot Oy:n ti-

loissa muutaman tunnin ajan ennen kokeellisen osion aloittamista. Tällöin laskimme soluja sisältävistä likvornäytteistä rinnakkaiset tulokset ja vertailimme saamiamme tuloksia sekä keskenämme että Fimlabin henkilökunnan saamiin tuloksiin. Kokeellisen osuuden aikana laskimme solumääristä rinnakkaiset tulokset silloin, kun molemmat meistä opinäytetyöntekijöistä olivat paikalla. Rinnakkaisista solulaskennoista saamamme tulokset olivat yhteneviä sekä solulaskennan harjoittamisen että kokeellisen tutkimuksen aikana.

Tutkimusaineistomme oli käytettävissä olevan ajan rajallisuuden vuoksi hyvin pieni, minkä takia saamamme tulokset ovat kyseenalaisia. Pienen näyteotoksen vuoksi tutkimuksestamme ei voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä likvornäytteen solujen säilyvyydestä. Näytteiden solumäärissä oli paljon vaihtelua, mikä osaltaan vaikeuttaa tulosten tulkintaa.

Alun perin tarkoituksenamme oli tutkia myös lämpötilan vaikutusta solujen säilyvyyteen. Koska näytteiden lukumäärä jäi todella pieneksi, ei vertailua kylmässä ja lämpimässä säilytettyjen näytteiden välillä voitu luotettavasti tehdä. Siksi keskityimme tutkimukseemme vertailemaan erytrosyyttien ja leukosyyttien säilyvyyttä.

Jatkotutkimuksena ehdotamme tutkimuksen tekemistä pidemmällä aikavälillä, jolloin näyteotos muodostuu suuremmaksi. Tutkimusaihe sopisi siten paremmin esimerkiksi pro gradu -tutkielman kuin opinnäytetyön aiheeksi. Myös tutkimusasetelmaa ja kokeellisen osion suorittamistapaa kannattaisi miettiä uudelleen. Jotta eroa kylmässä ja lämpimässä säilytettyjen näytteiden välillä voitaisiin luotettavasti tutkia, tulisi näyte jakaa heti saapumisen yhteydessä kahteen osaan, joista toista säilytetään huoneenlämmössä ja toista jääkaapissa. Tässä tutkimuksen haasteeksi tulee kuitenkin likvorin riittävyys.

Tutkimustyössämme on noudatettu tutkimustyön eettisiä periaatteita. Näiden periaatteiden mukaan tutkimustyössä ei plagioida toisen tekstiä tai syyllistyä itseplagiointiin. Tuloksia ei kaunistella, sepitetä tai yleistetä kritiikittömästi. Lisäksi tutkimuksessa tulee selostaa huolellisesti tutkimustyössä käytetyt menetelmät ja pyrkiä mahdollisimman kattavaan raportointiin. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2015, 23–27.) Tutkimustyössämme ei ole ollut suoria potilaskontakteja, vaan olemme saaneet käyttöömmme potilasnäytteet sen jälkeen, kun näytteet on jo kertaalleen tutkittu ja vastattu. Näytteet numeroitiin juoksevin numeroin, joten henkilötiedot pysyivät salassa koko tutkimuksen ajan.

Opinnäytetyöprosessin aikana olemme oppineet tekemään tieteellistä tutkimusta, yhdistämään teoreettista tietoa käytännön tutkimustyöhön ja laskemaan likvornäytteiden solujakammiossa. Lisäksi olemme saaneet uutta tietoa ja kokemusta tiedonhankinnasta sekä päässeet hyödyntämään oppimaamme teoreettisen osuuden kirjoittamisessa. Olemme hyötynneet opinnäytetyön tekemisestä myös siten, että olemme saaneet paljon uutta tietoa likvorista ja likvornäytteiden tutkimisesta.

Haluamme kiittää Fimlab Laboratoriot Oy:n henkilökuntaa avusta ja ohjauksesta opinnäytetyön eri vaiheissa, erityisesti kokeellisen osuuden aikana.

## LÄHTEET

Brunzel, N. 2004. Fundamentals of urine and body fluid analysis. 2. painos. Kiina: Saunders Elsevier. 326-332.

Chow, G. & Schmidley, J.W. 1984. Lysis of Erythrocytes and Leukocytes in Traumatic Lumbar Punctures. Archives of Neurology 41. 1084-1085.

de Graaf, M.T., van den Broek, P.D., Kraan, J., Luitwieler, R.L., van den Bent, M.J., Boonstra, J.G., Schmitz, P.I.M., Gratama, J.W. & Sillevius Smitt, P.A.E. 2011. Addition of Serum-containing Medium to Cerebrospinal Fluid Prevents Cellular Loss Over Time. Journal of Neurology 258. 1507-1512.

de Jongste, A.H.; Kraan, J., van den Broek, P.D., Brooimans, R.A., Bromberg, J.E., van Montfort, K.A., Sillevius Smitt, P.A. & Gratama, J.W. 2014. Use of TransFix™ Cerebrospinal Fluid Storage Tubes Prevents Cellular Loss and Enhances Flow Cytometric Detection of Malignant Hematological Cells After 18 Hours of Storage. Cytometry. Part B. Clinical cytometry 86 (4) 272-279.

Dux, R., Kindler-Röhrborn, A., Annas, M., Faustmann, P., Lennartz, K. & Zimmermann, C.W. 1994. A Standardized Protocol for Flow Cytometric Analysis of Cells Isolated from Cerebrospinal Fluid. Journal of the Neurological Sciences 121 (1). 74-78.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2014. Likvorin solut, kammiolaskenta. Työohje. Käyttöönottopäivä 9.4.2014.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2015. Tutki ja kirjoita. 19. painos. Kirjayhtymä Oy, 1997. Porvoo, Bookwell Oy.

LO-Laboroptik GmbH. 2015. Information about counting chamber (hemacytometer). Luettu. 2.9.2015. <http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info.html>

Pirttilä, T. & Oksi, J. 2001. Tarvitaanko selkäydinnestetutkimuksia 2000-luvulla? Suomen Lääkärilehti 14/2001. 1621.

Pitkänen, M. & Förster, J. 2014. Lannepiston aiheuttamat komplikaatiot. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 18/2014. 1834–1842.

Savolainen, E-R. 2010. Solulaskenta. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 71.

Sand, O., Sjaastad, Ø., Haug, E. & Bjälje, J. 2011. Ihminen. Fysiologia ja anatomia. 1. painos. Helsinki: WSOYpro Oy. 115–117.

Soinila, S. 2011. Kliininen neuroanatomia. Teoksessa Soinila, S., Kaste, M. & Somer, H. (toim.) Neurologia. 2.-5. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 40–42.

Soinila, S. & Launes, J. 2011. Neurologinen tutkimus. Teoksessa Soinila, S., Kaste, M. & Somer, H. (toim.) Neurologia. 2.-5. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 79–84.



- Steele, R.W., Marmer, D.J., O'Brien, M.D., Tyson, S.T. & Steele, C.R. 1986. Leukocyte Survival in Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 23 (5). 965-966.
- Strasinger, S. & Di Lorenzo, M. 2014. *Urinalysis and Body Fluids*. 6. painos. Yhdysvallat: F. A. Davis Company. 183.
- Taskinen, E. 1994. Selkäydinnesteen irtosolututkimukset. Teoksessa Koivuniemi, A. (toim.) *Kliininen sytologia. Irtosolu-, harjasolu- ja ohutneulabiopsiatutkimukset*. 1. painos. Kandidaattikustannus Oy. 319.
- Tourtellotte, W.W., Somers, J.F., Parker, J.A., Itabashi, H.H. & DeJong, R.N. 1958. A Study on Traumatic Lumbar Punctures. *Neurology* 8 (2) 129-134.
- Tuokko S., Rautajoki, A. & Lehto, L. 2008. *Kliiniset laboratorionäytteet. Opas näytteiden ottoa varten*. 1.-2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 82–84.
- Valo, H. 2015. *Henkilökohtainen tiedonanto*. 13.4.2015. Fimlab Laboratoriot Oy.
- Veerman, A.J.P., Huismans, L. & van Zantwijk, I. 1985. Storage of Cerebrospinal Fluid Samples at Room Temperature. *Acta Cytologica* 29 (2). 188–189.
- Vilpo, J. 1998. *Hematologia*. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino. 93.



