



Munuaisensiirtopotilaiden sytokiinimääritys Luminex[®] xMAP[®] -menetelmällä

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyytikko
Opinnäytetyö
7.4.2010

Jatta Etuaho
Liisa Honkala

Koulutusohjelma	Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma		
Tekijä/Tekijät		
Jatta Etuaho ja Liisa Honkala		
Työn nimi		
Munuaisensiirtopotilaiden sytokiinimääritys Luminex [®] xMAP [®] -menetelmällä		
Työn laji	Aika	Sivumäärä
Opinnäyte	Kevät 2010	32 + 5 liitettä
TIIVISTELMÄ		
<p>Toimimattomien munuaisten korvaaminen siirteellä on paras hoitomuoto potilaille, joille on kehittynyt terminaalinen munuaisten vajaatoiminta. Munuaistensiirrot aloitettiin Suomessa vuonna 1964, ja nykyään niitä tehdään vuosittain noin 200. Suurin osa siirteistä saadaan aivokuolleilta vainajilta. Hyvästä lääkehoidosta huolimatta, hyljintäreaktiot vaikeuttavat edelleen munuaisensiirtoja. Vastaanottajan immuunipuolustuksen aktivoitumisen aiheuttama hyljintä voi haitata munuaissiirteeseen käynnistymistä, ja tässä sytokiineilla on tärkeä rooli.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelulle. Työn tarkoituksena oli selvittää onko potilaan seerumin sytokiiniprofiililla merkitystä munuaissiirteeseen käynnistymisessä. Kolmen potilasryhmän sytokiinipitoisuuksia määritettiin eri aikapisteissä siirron jälkeen Luminex[®] xMAP[®]-menetelmää käyttäen. Potilaat oli jaettu ryhmiin munuaissiirteeseen normaalin ja hitaan käynnistymisen sekä hyljinnän perusteella. Näytteet oli otettu siirtopäivänä sekä 1, 3 ja 7 päivää siirron jälkeen. Työssä käytettiin Milliporen 13 sytokiinin (GM-CSF, IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13 ja TNFα) MILLIPLEX Map Human High Sensitivity -reagenssipakkausta.</p> <p>Yhdeksän sytokiinin (GM-CSF, IFNγ, IL-12(p70), IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 ja IL-13) pitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja potilasryhmien välillä. Niitä ei siten voi käyttää munuaissiirteeseen käynnistymisen seurannassa. IL-7, IL-8, IL-10 ja TNFα pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitseviä eroja joidenkin potilasryhmien välillä eri aikapisteissä. Näillä sytokiineilla voisi olla mahdollista erottaa potilasryhmät toisistaan, ja ne voivat olla hyödyllisiä siirteeseen käynnistymisen seurannassa.</p> <p>Tämän työn perusteella seerumin sytokiinipitoisuuksien määrittämisellä on mahdollista saada hyödyllistä tietoa munuaissiirteeseen toiminnasta. Jatkotutkimukset ovat tarpeen ennen menetelmän diagnostista käyttöä, ja tässä työssä saatuja tuloksia voi käyttää niiden pohjana.</p>		
Avainsanat		
munuaisensiirto, sytokiini, Luminex		

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care
Author/Authors		
Jatta Etuaho and Liisa Honkala		
Title		
Cytokine Assays of Kidney Transplant Patients Using Luminex® xMAP® Technology		
Type of Work	Date	Pages
Final project	Spring 2010	32 + 5 appendices
<p>ABSTRACT</p> <p>Kidney transplantation is the best method of treatment for patients with final stage renal disease. Kidney transplantations in Finland began in 1964. Each year around 200 kidneys are transplanted, most of which are from brain-dead donors. Despite good medication, the recipient's immune reaction against the donor kidney can be harmful. In this reaction, cytokines have an important role.</p> <p>This final project was commissioned by Finnish Red Cross Blood Service. The purpose of this project was to determine whether the kidney transplant recipient's cytokine profile is significant in the success of the transplantation. Cytokine concentrations of three recipient groups were measured using Luminex® xMAP® technology. Serum samples were collected on the day of the transplantation, and 1,3 and 7 days after the transplantation. Differences between patients with early graft function, delayed graft function and rejection were compared in this project. Millipore's MILLIPLEX Map Kit High Sensitivity Cytokine Panel was used for the quantification of 13 cytokines (GM-CSF, IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13 and TNFα).</p> <p>There were no significant differences between the recipient groups in serum levels of nine cytokines (GM-CSF, IFNγ, IL-12(p70), IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13). Therefore, these cytokines can not be used to monitor kidney transplant function. IL-7, IL-8, IL-10 and TNFα concentration levels had statistically significant differences between some recipient groups at different time points. It could be possible to differentiate the recipient groups with these four cytokines, and thus be useful in monitoring kidney transplant function.</p> <p>In conclusion, the results of this project support the clinical use of some cytokines in kidney transplantation. Nonetheless, this field of cytokine use is still very unknown and additional research is needed.</p>		
Keywords		
kidney transplantation, cytokine, Luminex		

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	MUNUAISENSIIRROT	2
2.1	Tutkimukset ennen siirtoa	3
2.2	Siirteen käynnistyminen	4
2.3	Potilaan seuranta munuaisensiirron jälkeen	5
3	SYTOKIINIT	6
3.1	Sytokiinien toiminta	7
3.2	Sytokiiniprofiilit elinsiirroissa	7
3.3	Sytokiinien määrittäminen	9
4	TYÖN TAVOITTEET JA KOEASETELMA	11
5	TYÖN SUORITTAMINEN	12
5.1	Työprosessin kuvaus	12
5.2	Aineisto	13
5.3	Käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit	14
5.4	Luminex [®] xMAP [®] -menetelmä	14
5.5	Sytokiinien määrittäminen Luminex-menetelmällä	15
6	TULOKSET	18
6.1	Tulosten tilastollinen tarkastelu	18
6.2	Sytokiinipitoisuuksien erot potilasryhmien ja aikapisteiden välillä	19
6.3	Tulosten yhteenveto ja johtopäätökset	25
7	TULOSTEN LUOTETTAVUUS	26
8	POHDINTA	27
	LÄHTEET	30
	LIITTEET 1 - 5	

1 JOHDANTO

Elinsiirtotoiminta aloitettiin Suomessa vuonna 1964 munuaisensiirrolla. Hylkimisenesto-
lääkityksen kehittyessä 1980-luvulla alettiin siirtää myös muita elimiä, kuten sydämiä,
maksoja ja keuhkoja. (Huhtamies – Relander 1997: 29, 49.) Nykyään Suomessa teh-
dään parisataa munuaisensiirtoa vuodessa, joista suurin osa saadaan aivokuolleilta
luovuttajilta (Transplantation figures 2009).

Toimimattomien munuaisten korvaaminen siirteellä on paras hoitomuoto potilaille, joille
on kehittynyt terminaalinen munuaisten vajaatoiminta. Onnistunutta munuaisensiirtoa
seuraa parhaimmillaan potilaan täydellinen kuntoutuminen. Hyljintäreaktion vuoksi me-
netetään kuitenkin edelleen siirteitä, ja siirteen toiminnan seuraaminen on siten erittäin
tärkeää. (Eklund 2002: 154–155.)

Munuaisensiirron yhteydessä elimistön immuunipuolustus aktivoituu, ja voi aiheuttaa
hyljintäreaktioita. Tässä aktivaatiossa sytokiineilla on tärkeä rooli. (Kokko – Lakkis
2000:35.) Sytokiinit ovat pienimolekyylisiä proteiineja, jotka säätelevät immuunireaktioi-
ta monilla eri keinoilla (Kuby 1997:313). Viime vuosina on kiinnostuttu siitä, voisiko sy-
tokiiniprofiilin määrittämisellä saada lisää tietoa munuaisensiirron onnistumisesta. (Hu –
Knechtle 2006: 165.)

Sytokiinipitoisuuksien määrittämisessä standardimenetelminä ovat entsyymi-
immunomenetelmät, joita rajoittaa kuitenkin se, että sytokiinit määritetään yksitellen.
Virtauscytometriaan perustuvien multiplex-menetelmien etuna on mahdollisuus useiden
sytokiinien samanaikaiseen määrittämiseen. Tämä helpottaa sytokiinien verkostomaisen
toiminnan tutkimista ja lisää menetelmän suosiota sytokiinitutkimuksissa. (Jimenez ym.
2005: 46.)

Tämä opinnäytetyö tehtiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelun potilastutkimusyksis-
kölle. Työn tarkoituksena oli selvittää, onko potilaan seerumin sytokiiniprofiililla merki-
tystä munuaissiirännäisen käynnistymisessä. Työssä tarkasteltiin sytokiinipitoisuuksia
kolmessa eri potilasryhmässä. Potilaat oli jaettu ryhmiin munuaissiirteen normaalin ja
hitaan käynnistymisen sekä hyljinnän perusteella. Potilasryhmien sytokiinipitoisuuksia
määritettiin eri aikapisteissä siirron jälkeen Luminex[®] xMAP[®]-menetelmää käyttäen.
Sytokiinipitoisuuksien määrittämisessä käytettiin Milliporen Milliplex[™] MAP High Sensi-
tivity Human Cytokine -reagenssipakkausta. Työn teoriaosuudessa käsitellään munu-
aisensiirtoja, sytokiineja ja niiden määrittämistä sekä Luminex[®] xMAP[®] -menetelmää.

2 MUNUAISENSIIRROT

Elinsiirtoja voidaan käyttää parantumattoman sairauden hoitona. Suomessa aloitettiin elinsiirtotoiminta munuaisensiirrolla (Salmela – Höckerstedt – Salminen – Hämmäinen 2004: 1359). Nykyään Suomessa tehdään munuaisen, maksan, sydämen, keuhkojen ja luuytimen siirtoja. Vuoden 2008 loppuun mennessä Suomessa oli tehty kiinteiden elinten siirtoja noin 7000, joista 5400 oli munuaisensiirtoja. (Jalanko 2009.) Vuosittain Suomessa tehdään noin parisataa munuaisensiirtoa (Tranplantation figures 2009).

Ensimmäinen onnistunut munuaisensiirto tehtiin Yhdysvalloissa vuonna 1954. Suomen ensimmäinen munuaisensiirto tehtiin vuonna 1964. Potilas oli 31-vuotias mies, ja luovuttajana hänen äitinsä. Heillä oli sama veriryhmä, mutta mitään varsinaista immunologista tyypitystä ei tehty. Potilas oli jo ennen leikkausta erittäin huonokuntoinen ja menehtyi kaksi viikkoa leikkauksen jälkeen. Toinenkin siirto, vuonna 1965, epäonnistui hyljinnän takia. Vuonna 1966 tehtiin jo kolme onnistunutta siirtoa eläviltä omaisluovuttajilta. Onnistumisen syynä oli immunosuppression ja siten hyljinnän parempi hallinta. Seuraavana vuonna otettiin käyttöön uusi kudostyypitysmenetelmä, joka yhdessä immunosuppression kehityksen kanssa edelleen vähensi siirteiden hyljintää. Ensimmäinen siirto kuolleelta luovuttajalta tehtiin vuonna 1968, ja aluksi munuaisten laatu ei ollut hyvä. Vasta kun kuoleman määritelmäksi tuli aivokuolema (vuonna 1971) siirrettävien munuaisten laatu parani. (Huhtamies – Relander 1997: 28–33.) Ajan myötä munuaisensiirtojen tulokset ovat parantuneet huomattavasti, ja vuonna 2003 jo 94 % siirännäisistä toimi vuoden kuluttua siirrosta (Salmela – Kyllönen 2003: 507).

Munuaisensiirtojonossa on jatkuvasti noin 300 potilasta. Yleisimmät syyt munuaisensiirtoon ovat diabetes, polykystinen tauti, glomerulonefriitti, interstitiaalinen nefriitti ja virtsateiden dysplasiat. (Salmela ym. 2004: 1359.) Munuaisensiirtoon pääsyn ensisijaisena valintakriteerinä pidetään hyvää kudossopeutuvuutta luovuttajan ja vastaanottajan välillä, mikä takaa parhaan pitkäaikaistuloksen. Luovuttajan veriryhmän ja kudostyyppin perusteella valitaan munuaisensiirtojonosta 10-12 parhaiten soveltuvaa potilasta sopivuustutkimuksiin. Niistä, joille siirrettävä munuainen sopii tehdään valinta ottaen huomioon muun muassa odotusajan pituus sekä ikäsopivuus. (Salmela – Kyllönen 2003: 508.)

Munuainen voidaan siirtää elävältä omaisluovuttajalta tai aivokuolleelta vainajalta. Vuonna 2009 Suomessa tehdyistä munuaisensiirroista 96 % oli peräisin aivokuolleilta luovuttajilta ja 4 % eläviltä luovuttajilta (Transplantation figures 2009). Elävien luovuttajien munuaisensiirtoihin liittyy paljon eettisiä kysymyksiä, jotka hankaloittavat toimintaa

sekä lääkäreiden että omaisten kannalta. Tämä selittää osaltaan Suomen pienen omaissiirtojen osuuden.

Elinsiirtoja säätelee laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä. Elinsiirtojen osalta olennaista laissa on luovuttajan suostumus, ja elävän luovuttajan kohdalla erityisesti tietoon perustuva ja peruutettavissa oleva suostumus ilman painostamista ja lupauksia vastikkeista sekä palkkioista. Nykysäännöksen mukaan omaisilla on oikeus kieltää luovutus silloin kun vainajan omaa mielipidettä ei tunneta tai sitä ei ole. (Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä 101/2001 § 3 ja 9.) 29.12.2009 annettu hallituksen esitys lakimuutoksesta pyrkii lisäämään elinsiirtoja muuttamalla kuolleelta tapahtuvaa elimien, kudosten ja solujen irrottamista koskevaa suostumussäännöstä. Elimiä voitaisiin irrottaa, jos tiedossa ei ole tai jos ei ole syytä olettaa, että vainaja olisi eläessään vastustanut toimenpidettä (oletettu suostumus). Hallituksen esityksen tavoite on painottaa henkilön omaa näkemystä elinluovutukseen ja helpottaa omaisten asemaa vaikeassa tilanteessa. (HE 276/2009 vp: 1–8.)

2.1 Tutkimukset ennen siirtoa

Munuaisensiirteeseen vastaanottajan immuunireaktio siirrännäisen vieraita antigeenejä vastaan on suurin haaste onnistuneelle elinsiirrolle. Tässä immuunireaktiossa kudossopeutuvuusjärjestelmällä on suuri merkitys. Ihmisen kudossopeutuvuusjärjestelmän (human leukocyte antigen, HLA) geenien koodittamat molekyylit ovat solumembraanin integraalisia molekyylejä, joilla on tärkeä tehtävä antigeenin esittelyssä immuunivasteelle. Mikäli siirrännäisen saajan ja luovuttajan HLA-geenit eroavat toisistaan, tunnistavat saajan T-solut vieraan elimen HLA-molekyylit ja pyrkivät hylkimään sitä. Munuaisensiirron tulokset ovat sitä paremmat mitä vähemmän luovuttajan ja saajan HLA-geenit eroavat toisistaan. (Partanen 2005: 680, 689.)

Munuaisensiirtojonossa olevalta henkilöltä tutkitaan mahdolliset valkosolu-vasta-aineet ja niitä seurataan kolmen kuukauden välein sekä 2-4 viikkoa mahdollisten verensiirtojen jälkeen. Ennen siirtoa selvitetään vastaanottajan ja luovuttajaehdokkaan välinen kudossopeutuvuus. HLA-geenien tulisi olla mahdollisimman samanlaiset. Kudossopeutuvuuden perusteella sopivan luovuttajan löydyttyä tehdään lisäksi valkosolujen sopivuuskoe, jonka tulee ehdottomasti olla negatiivinen. Vastaanottajalla ei saa olla vasta-aineita luovuttajan valkosoluja vastaan. Ennen siirtoa määritetään aina HLA-geenit A, B ja DR, ABO- ja Rh-veriryhmä sekä mahdolliset valkosoluvasta-aineet. (Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008: 73, 81-82.)

2.2 Siirteen käynnistyminen

Parhaimmillaan munuassirre käynnistyy heti leikkauksen jälkeen. Tällöin virtsan erittyminen on normaalia, eikä dialyysia tarvita. Onnistuneen siirron jälkeen potilaat saavuttavat vakaan munuaistoiminnan jo ensimmäisen viikon aikana. (Amend – Vincenti – Tomlanovich 2001: 169–170.)

Munuaisensiirteen hidas käynnistyminen (delayed graft function, DGF) tarkoittaa sitä, että siirretty munuainen ei toimi heti normaalisti. Tarkka määritelmä DGF:lle puuttuu, mutta yleisesti rajana on pidetty dialyysin tarvetta ensimmäisen viikon aikana siirron jälkeen. Munuaisensiirtojen hallinnan parantuminen ei ole vähentänyt DGF:n esiintymistä ja syyksi tähän on arveltu elinluovuttajien kriteerien laajentamista. (Perico – Cataneo – Sayegh – Remuzzi 2004: 1814.) Siirrännäisen pitkällä kylmäiskemia-ajalla sekä luovuttajan kuolinsyyllä ja korkealla iällä on vaikutusta hitaaseen käynnistymiseen (Pfaff ym. 1998:219).

Tuoreessa englantilaisessa tutkimuksessa todettiin, että DGF on yleisempää potilailla, joille on siirretty munuainen laajennetun kriteerin elinluovuttajalta. Tällaisiksi määriteltiin kaikki yli 60 vuotiaat sekä 50-59 vuotiaat joilla toteutui ainakin kaksi seuraavista väittämistä: kohonnut verenpaine, terminaalinen kreatiniini yli 1,5 g/dL tai kuoleman syynä aivoverenkiertohäiriö. Tutkimuksen mukaan DGF ei kuitenkaan vaikuttanut siirteen pitkäaikaiselvytykseen. (Fraser ym. 2010: 88–90.)

Vakava immunologinen hyljintäreaktio siirrettä vastaan voi aiheuttaa ongelmia. Hyljintä luokitellaan siirrosta kuluneen ajan mukaan hyperakuutiksi, akuutiksi tai krooniseksi. Hyperakuutti hyljintä alkaa välittömästi verenkierron yhdistämisen jälkeen, ja se on vasta-ainevälitteinen. Potilaalla on tällöin vasta-aineita siirrettä vastaan jo ennen siirtoa. Hyperakuutti hyljintä johtaa yleensä siirteen menettämiseen. Jos valkosolujen sopivuuskoe on negatiivinen ja siirto tehdään ABO-veriryhmän mukaisesti, on hyperakuutti hyljintä harvinainen. Akuutti hyljintäreaktio ilmenee yleensä ensimmäisten viikkojen aikana ja se on tavallisesti soluvälitteinen, eli lymfosyyttien välittämä tulehdusreaktio. Se alkaa äkillisesti ja siirteen toiminta heikkenee nopeasti. Akuutin hylkimisen oireita ovat esimerkiksi kuume, siirteen turpoaminen, vähentynyt virtsaneritys, painonnousu ja albumiinin ilmaantuminen virtsaan. Jos hyljintä alkaa kolmen kuukauden jälkeen siirrosta, se voi edetä krooniseksi asteittain kuukausien ja vuosien aikana. Krooninen hyljintä etenee yleensä lopulta dialyysihoidon aloittamiseen ja mahdolliseen uuteen munuaisensiirtoon. (Eklund 2002: 158; Helderma – Goral 2001: 32–34.)

Nykyään siirteen akuutti hylkiminen on harvinaista tehokkaan lääkityksen ansiosta. Immunosuppressiivisellä lääkityksellä muunnetaan vastaanottajan immunologisia torjuntamekanismeja siten, että ne eivät kykene hylkimään siirrännäistä. (Eklund 2002: 158.) Immunosuppressio parani huomattavasti, kun siklosporiini A otettiin potilaskäyttöön 1980-luvun alussa. Se, samoin kuin myöhemmin kehitetty takrolimuusi, salpaa T-lymfosyyttien aktivoitumiseen tarvittavien välittäjäaineiden vapautumista ja siten estää hyljinnän erittäin tehokkaasti. Siklosporiini poikkesi edeltäjistään siinä, että se vaikuttaa täsmällisesti vain siihen mihin pitääkin, eikä estä kaikkea kohdealueen solutoimintaa. (Huhtamies – Relander 1997: 49–52.)

2.3 Potilaan seuranta munuaisensiirron jälkeen

Keskitetty varhaisvaiheen hoito takaa riittävän asiantuntemuksen harvinaisten komplikaatioiden hoidossa, mikä parantaa siirtojen varhaistuloksia (Salmela – Kyllönen 2003: 510). Munuaisensiirtoleikkauksen jälkeinen seuranta tapahtuu Kirurgisessa sairaalassa, joka on ainoa Suomessa aikuisten munuaisensiirtoleikkauksia tekevä sairaala. Lasten munuaisensiirrot tehdään Lasten ja nuorten sairaalassa. Potilaan päästyä sairaalasta, hän siirtyy oman sairaanhoitopiirinsä asiakkaaksi. Sairaanhoitopiirit päättävät itsenäisesti siirtopotilaiden seurannasta, eikä koko Suomea kattavaa hoito-ohjetta ole tehty. (Merenmies 2010.)

Leikkauksen jälkeistä tilaa selvittäviä laboratoriotestejä ovat esimerkiksi täydellinen verenkuvasta, elektrolyytit, kreatiniini, glukoosi ja virtsan viljely. Suuret plasman kreatiniinipitoisuuden nousut ovat lähes aina merkki mahdollisesta siirteen huonosta menestymisestä. (Amend ym. 2001: 164, 177.) Kreatiniini on peräisin lihasten kreatiniinista ja kreatiniinifosfaatista. Se poistuu elimistöstä munuaisten kautta, suodattuen vapaasti glomeruluksesta. Plasman kreatiniinipitoisuus nousee, kun glomerulusfiltraatio heikenee merkittävästi. (Kreatiniini, plasmasta 2009.) Plasman gelatinaasiin assosioitunut lipokaliini on myös munuaisvauriota ennakoiva merkkiaine. Äkillisessä munuaisvauriossa gelatinaasiin assosioitunut lipokaliini nousee aikaisemmin kuin plasman kreatiniini ja se myös palautuu nopeammin normaalille viitealueelle. (Neutrofiilin gelatinaasin assosioitunut lipokaliini, plasmasta. 2009.)

Munuaisbiopsia tehdään yleensä silloin, kun siirtopotilaalla on hyljintään viittaavia oireita (Nast – Cohen 2001: 290). Silva ym. (2007: 376–377) tutkivat munuaisbiopsian tarpeellisuutta munuaissiirrännäisen toimintahäiriön diagnosoinnissa ja hoidossa. Tutkimuksessa todettiin, että huomattavassa osassa potilastapauksista munuaisbiopsian

tulos erosi kliinisestä diagnoosista ja hoitoa muutettiin biopsian tuloksen perusteella. Munuaisbiopsia on siis tällä hetkellä korvaamaton tutkimus hyljintädiagnostiikassa.

3 SYTOKIINIT

Sytokiinit ovat pienimolekyylisiä proteiineja, jotka aktivoivat elimistön soluja sytokiinireseptorien välityksellä. Sytokiinien ja reseptorien välillä on yleensä erittäin suuri affiniteetti, jonka ansiosta hyvin pienet sytokiinipitoisuudet saavat aikaan biologisen vaikutuksen. Sytokiineja erittyy sekä luonnollisessa että hankitussa immuunipuolustuksessa. Ne voivat vaikuttaa solun omaan toimintaan (autokriinisesti), lähellä olevan solun toimintaan (parakriinisesti) tai verenkierron kautta systeemisesti (endokriinisesti). Sytokiinien toiminta elimistössä on hyvin laaja-alaista ja monimutkaista, yksi sytokiini on harvoin reaktion aiheuttaja. Sytokiinit säätelevät immuunireaktioiden kestoa ja voimakkuutta säätelemällä vasta-aineiden ja toisten sytokiinien eritystä. Yksittäinen sytokiini vaikuttaa yleensä useaan solutyyppiin ja lisäksi sillä voi olla monta eri vaikutusta samaan soluun. Eri sytokiineilla on myös samanlaisia vaikutusmekanismeja soluissa. (Julkunen – Silvennoinen – Hurme 2007: 734; Stevens 2003: 77–78; Kuby 1997: 313.)

Elimistön puolustusmekanismit jaetaan luonnolliseen immuniteettiin ja mikrobi- tai antigeenispesifiseen hankittuun immuniteettiin. Luonnollinen immuniteetti aktivoituu heti elimistön kohdatessa vieraan antigeenin. Sillä on rajallinen kyky tunnistaa elimistölle vieraita rakenteita. Reaktiot toistuvat aina samankaltaisina ja nopeina. Luonnollisen immuniteetin tärkeimmät toimijat ovat fagosyytit ja komplementtijärjestelmä. Fagosyyttien erittämät sytokiinit lisäävät verisuonten läpäisevyyttä sekä niiden kiinnittymisominaisuuksia ja ne houkuttelevat tulehduspaikalle muita soluja ja molekyylejä. Nämä aiheuttavat tulehdusreaktion näkyvät oireet. (Meri 2007: 619; Stevens 2003: 79.)

Hankittu immuniteetti pystyy tunnistamaan rajattoman määrän antigenejä. Tehokkaan puolustusreaktion synty kestää ensimmäisellä kerralla useita päiviä, mutta seuraavan antigenikontaktin aiheuttama reaktio on nopeampi. Hankitun immuniteetin pääosat ovat B-lymfosyyteistä kehittyneiden plasmasolujen tuottamat vasta-aineet sekä T-lymfosyytit, joiden pinnalla on antigenejä tunnistavia T-solureseptoreita. (Meri 2007: 619.)

3.1 Sytokiinien toiminta

Sytokiinit säätelevät solujen kasvua ja erilaistumista, stimuloivat tai vaimentavat tulehdusreaktioita ja säätelevät hankitun immunitietin kehittymistä. Kemotaktiset sytokiinit eli kemokiinit houkuttelevat leukosyyttejä tulehduspaikalle. Kemokiinin sitoutuminen solun pinnan reseptoriin mahdollistaa solun tunkeutumisen verisuonen seinämän endoteelisolujen välistä kudokseen. Proinflammatoriset sytokiinit aktivoivat kohdesoluja tuottamaan kemokiinejä, proinflammatorisia sytokiineja sekä muita biologisesti aktiivisia aineita, ja vahvistavat siten tulehdusreaktiota. Anti-inflammatoriset sytokiinit vaimentavat tulehdusreaktion voimakkuutta. Ne estävät kudostuhoa vähentämällä solujen liiallista stimuloitumista. Interferonit stimuloivat antiviraalisesti vaikuttavien molekyylien ilmentymistä, jolloin virusten lisääntyminen soluissa vähenee tai estyy kokonaan. Th1-tyyppiset sytokiinit liittyvät soluvälitteisen immunitietin toimintaan ja Th2-tyyppiset sytokiinit säätelevät vasta-ainevälitteisen immunitietin kehittymistä. Kasvutekijöinä toimivat sytokiinit ovat tärkeitä leukosyyttien erilaistumisessa ja lisääntymisessä. (Julkunen – Silvennoinen – Hurme 2007: 735–740.)

Sytokiinit huolehtivat monista elimistön tapahtumista, jotka liittyvät tulehdukseen, kudostuhoon ja näistä johtuviin yleisoireisiin. Ne toimivat yleensä jonkin muun tekijän laukaiseman reaktion välittäjäaineina, ja ovat harvoin itsenäinen tekijä tautiprosessissa. Sytokiinitasojen tutkiminen voi antaa tärkeää tietoa elimistön tilasta. Sytokiinien diagnostista käyttöä tutkitaankin nykyään laajalti. Erilaisilla immunologisilla tutkimusmenetelmillä voidaan mitata sytokiinitasoja elimistön nesteistä luotettavasti. Sytokiinit toimivat verkostomaisesti ja niiden toiminta on päällekkäistä, joten yksittäisen sytokiinipitoisuuden merkitystä on vaikea arvioida. Useilla sytokiineilla on jo vakiintunut terapeuttinen käyttötarkoitus, esimerkiksi joidenkin leukemioiden, munuaiskarsinooman, pahanlaatuisen melanooman hoitoon käytetty IFN α ja multippeliskleroosin hoitoon käytetty IFN β (Liite 1). (Julkunen – Silvennoinen – Hurme 2007: 744–745.)

3.2 Sytokiiniprofiilit elinsiirroissa

Sytokiinit ovat tärkeässä osassa elimistön tulehduksissa sekä immunologisissa reaktioissa, jotka molemmat liittyvät tiiviisti myös elinsiirtojen onnistumiseen. Nykyään tutkitaankin yhä enemmän sytokiinipitoisuuksien merkitystä elinsiirrännäisten selviytymisessä. Näiltä tutkimuksilta odotetaan uusia diagnostisia menetelmiä elinsiirtopotilaiden seurannassa.

Yhdysvalloissa on tutkittu plasman sytokiinien merkitystä keuhkosiirteen toimintahäiriössä (primary graft dysfunction, PGD). Tutkimuksessa mitattiin plasman sytokiinien pitoisuuksia ennen siirtoa ja 6, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua siirrosta. PGD-potilaiden (n=25) tuloksia verrattiin kontrolliryhmään (n=25), jolla ei ollut PGD:tä. Sytokiineja oli neljästä eri ryhmästä: proinflammatorisia sytokiineja (IL-1 β , IL-2, IL-2R, IL-5, IL-7, IL-12 ja TNF α), anti-inflammatorisia sytokiineja (IL-1Ra, IL-4, IL-6, IL-10 ja IL-13), kemokiinejä, jotka houkuttelevat neutrofiileja (IL-8) sekä kemokiinejä, jotka houkuttelevat monosyyttejä ja lymfosyyttejä (IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α ja MIP-1 β) (Liite 1). Tutkimuksessa saatiin hyödyllistä tietoa plasman sytokiinitasoista keuhkosiirtoleikkauksen jälkeen. PGD-potilailla plasman MCP-1 ja IP-10 -tasot nousivat, ja tutkijat pitivät sitä lupaavana merkinä PGD:n varhaiselle havaitsemiselle. (Hoffman ym. 2009: 389–394.)

Sytokiiniprofiilin muutoksia on tutkittu myös haiman saarekesolujen siirtojen yhteydessä. Saarekesolujen siirto on tyypin 1 diabeteksen hoitomahdollisuus, joka onnistuessaan voi palauttaa potilaalle normaalin insuliinin tuotannon. Siirrännäisen hyljintä voi kuitenkin estää insuliinituotannon normalisoitumisen. Huurmanin ym. tutkimuksessa mitattiin lymfosyyttiviljelmien sytokiinitasoja (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, IFN γ ja TNF α) (Liite 1) ennen ja jälkeen saarekesolujen siirron. Sytokiiniprofiilit ennen siirtoa eivät olleet yhteydessä siirron onnistumiseen. Potilailla, joilla insuliinin tuotanto normalisoitui, muuttui sytokiiniprofiili Th2-tyyppiseksi ja IL-10:n erittyminen lisääntyi. Tutkimuksen mukaan sytokiinitasot korreloivat saarekesolujen siirron onnistumisen kanssa ja tästä todettiin olevan hyötyä siirrännäisten selviytymisen tutkimisessa. (Huurman ym. 2009: 382–388.)

Teppo (2005: 19, 41, 49) tutki väitöskirjassaan virtsan mukana erittyviä munuaissiirrännäisen komplikaatioista varoittavia proteiineja. Tulehdukseen liittyvällä sytokiinilla, IL-1 β :lla on endogeeninen estäjäproteiini IL-1 β ra, joka sitoutuu IL-1 reseptoreihin ja estää täysin IL-1:n haitalliset vaikutukset soluissa (Liite 1). Tutkimuksessa todettiin, että ne potilaat, joilla oli hyljinnän oireita erittivät virtsaan enemmän IL-1 β ja vähemmän IL-1 β ra:ta. Tulos ilmoitettiin suhdelukuna IL-1 β ra/ IL-1 β . Keskiarvo IL-1 β ra/ IL-1 β -suhteesta oli myös merkitsevästi alempi hyljintäpotilailla ($9,5 \pm 15,7$, $p < 0,05$) kuin normaalisti käynnistyvien siirteiden saajilla (47 ± 62 , $p < 0,05$). Niillä potilailla, joilla munuaissiirre käynnistyi normaalisti suhdeluku pysyi vakaana koko kolmen viikon seuranta-jakson ajan.

Yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa selvitettiin sytokiinipitoisuuksia munuaisensiirtopotilailta, joilla oli hyljintäreaktio. Sytokiinipitoisuudet (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF α ja IFN γ) mitattiin sekä plasmasta että virtsasta kuuliin perustuvalla multiplex-menetelmällä hyl-

jintäpotilailta ja potilailta, joilla siirre toimi normaalisti. Tutkimuksessa todettiin, että hyljintäpotilailla oli korkeammat IL-10- ja INF γ -pitoisuudet sekä plasmassa että virtsassa. (Jimenez ym. 2005: 46–49.)

Puolalaisessa tutkimuksessa selvitettiin munuaisensiirtopotilaiden seerumin sytokiini-profiileja. Tutkimusjoukko koostui potilaista, joilla oli akuutti hyljintäreaktio, krooninen hyljintä tai pitkäaikaisia vakaita jaksoja. Potilaista tutkittu seeruminäyte oli otettu silloin kun hyljintä oli diagnosoitu. Seeruminäytteistä määritettiin seuraavat sytokiinipitoisuudet: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, INF γ ja TNF α . Tutkimuksessa osoitettiin, että akuutin hyljinnän potilailla INF γ - ja IL-10 -tasot nousivat. Kroonisen hyljinnän potilailla, pääosin Th2-solujen erittämät, IL-4, IL-6 ja IL-10 pitoisuudet nousivat. Vakaiden jaksojen potilailla INF γ -tuotanto lisääntyi ja Th2-solujen tuottamien sytokiinien pitoisuudet laskivat. (Karcwesi ym. 2009: 4147–4149.)

Useissa kansainvälisissä tutkimuksissa on viime vuosina käsitelty sytokiinien merkitystä elinsiirroissa. Tutkimuksissa on löydetty lupaavaa tietoa siirrännäisten käynnistymisen seurannasta. Lisää tutkimusta tarvitaan kuitenkin ennen menetelmien ottamista diagnostiseen käyttöön. Munuaisensiirtoihin liittyvää sytokiinitutkimusta on tehty pääasiassa hyljinnän aikana otetuista näytteistä. Sytokiinien merkitystä hitaasti käynnistyvissä munuaissiirteissä ei ole tutkittu.

3.3 Sytokiinien määrittäminen

Sytokiinipitoisuuksien mittaamisessa pitkäaikainen standardi on ollut entsyymi-immunomenetelmä (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). ELISAssa vasta-aine on kiinnittyneenä kuoppalevyn kaivon pohjaan, näytteessä oleva analyytti kiinnittyy vasta-aineeseen ja lopuksi siihen kiinnittyy leimattu detektiovasta-aine. 1990-luvun lopussa Luminex Corporationin kehittämä virtaussytometriaan perustuva menetelmä oli ensimmäinen, jolla voitiin mitata useita analyyttejä samanaikaisesti. Kuuliin perustuvassa multiplex-menetelmässä kerrosperiaate on muuten sama, mutta vasta-aineet ovat irrallaan liuoksessa kuulien pinnalla. ELISAssa detektiovasta-aineena käytetään entsyymillä vahvistettua kolorimetristä substraattia, kun multiplex-menetelmissä mittaus perustuu fluoresenssiin. (Elshal – McCoy 2006: 318–320.)

Yleisin multiplex-menetelmistä perustuu virtaussytometriaan, muut menetelmät perustuvat kemiluminesenssiin tai elektrokemiluminesenssiin. ELISAn ja kuulia käyttävän multiplex-menetelmän välisiä vertailuja on julkaistu vähän. Vertailututkimusten ongelma on myös ollut käytettyjen reagenssien valmistajien puutteellinen raportointi. (Elshal –

McCoy 2006: 318–320.) Menetelmien vertailua haittaa myös yleisesti hyväksytyjen ikään suhteutettujen viitearvojen puuttuminen (Leng ym. 2008: 880).

Yhdysvaltalaisutkimuksessa verrattiin neljän valmistajan reagensseja viiden eri sytokiinin mittauksessa Luminex-laitteella. Lisäksi mitattiin IL-8 ELISAlla kahdella eri reagenssilla ja verrattiin näitä tuloksia Luminex-laitteella saatuihin tuloksiin. Tutkimuksessa havaittiin, että vaikka absoluuttiset pitoisuudet vaihtelivat, niin tulokset seurasivat samaa trendiä kaikkien valmistajien reagensseilla. Tutkimuksen mukaan vertailu ELISAn kanssa tuotti erittäin hyvin korreloivat tulokset silloin kun käytettiin saman valmistajan reagensseja ($r=0,96$, $p=0,000$). (Khan – Smith – Reda – Suffredini – McCoy 2004: 35–39.)

Leng ym. (2008: 879–884) vertasivat sytokiinipitoisuuksien määrittämisessä ELISAA ja multiplex-menetelmiä, joilla oli artikkelin mukaan useita etuja ELISAan verrattuna. Tuloksia saadaan paljon lyhyessä ajassa, näytettä tarvitaan todella vähän tutkimusta kohden (neljän sytokiinin mittaukseen riittää 25 μ l seerumia, kun ELISAlla tarvitaan 1100 μ l), menetelmä on erittäin kustannustehokas sekä rahan että käytetyn ajan suhteen ja mittaustulokset ovat luotettavia, vaikka mitattavien sytokiinien pitoisuudet vaihtelevat suuresti. Kirjoittajat totesivat, että ELISAlla erot plasma- ja seeruminäytteiden välillä ovat vähäiset, kun taas multiplex-menetelmissä näytteen koostumuksella saattaa olla vaikutusta sytokiinipitoisuuksiin. Multiplex-menetelmän ongelmana on myös vakio-kuvaajan muodostaminen, etenkin pitoisuuksien ääripäissä. Tämä vaikuttaa tulosten luotettavuuteen hyvin pienissä ja hyvin suurissa pitoisuuksissa.

ELISA on edelleen sytokiinimäärityksen standardimenetelmä, mutta viime vuosina on tehty useita tutkimuksia ja selvityksiä multiplex-menetelmien soveltuvuudesta. Näiden tutkimusten mukaan multiplex-menetelmiä voidaan pitää luotettavina sytokiinimäärityksissä, mutta vertailumenetelmä on edelleen ELISA. Khan ym. (2004: 35-39) totesivat tutkimuksensa tuloksissa kuitenkin myös, että sytokiineja määritetään yleensä sarjoitain, ja tuloksia (hoidon tehoa tai operaatiosta toipumista) tarkastellaan enemmänkin pitoisuuksien muutoksina aikapisteiden välillä kuin absoluuttisina pitoisuuksina.

4 TYÖN TAVOITTEET JA KOEASETELMA

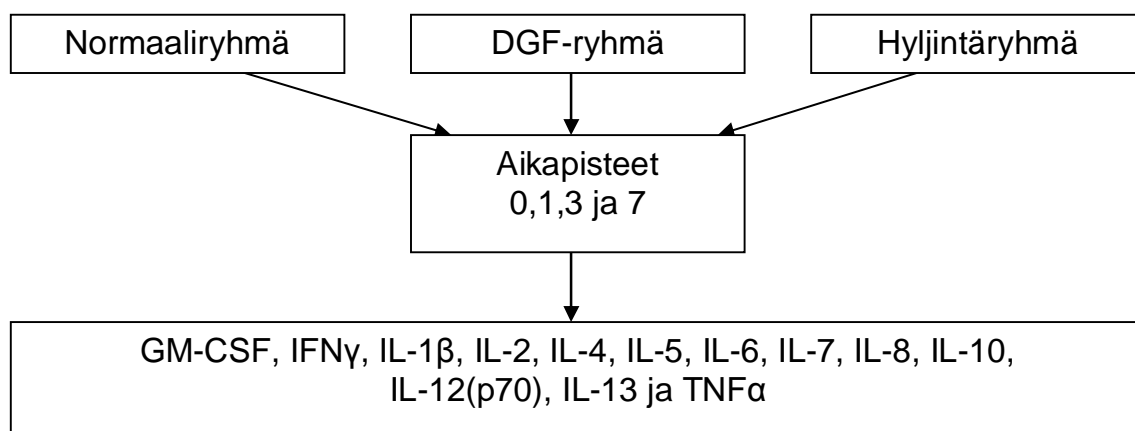
Määritämme tässä työssä Luminex® xMAP® -menetelmää käyttäen munuaisensiirtopotilaiden seerumin sytokiinipitoisuuksia. Käsittelemme saamiamme tuloksia tilastollisilla menetelmillä. Tulosten perusteella voidaan arvioida menetelmän käytettävyyttä yleisesti sekä munuaissiirteiden seurannassa.

Työn tavoitteena on selvittää:

Millä tavalla munuaissiirteiden normaali ja hidas käynnistyminen sekä hyljintä ovat havaittavissa seerumin sytokiinipitoisuuksissa ja miten kolmen potilasryhmän sytokiinipitoisuudet vaihtelevat eri aikapisteissä?

- Tarkastelemme minkälaisia eroja sytokiinipitoisuuksissa on potilasryhmien välillä eri aikapisteissä (siirtopäivänä (0) sekä 1, 3 ja 7 päivää siirron jälkeen) käyttäen Mannin-Whitneyn U ja Kruskalin-Wallis testejä.
- Selvitämme onko potilasryhmien sytokiinipitoisuuksissa samansuuntaisia muutoksia aikapisteiden välillä käyttäen apuna Friedmanin sekä Wilcoxonin testejä.

Käytämme Milliporen Milliplex™ MAP High Sensitivity Human Cytokine - reagenssipakkausta, jolla määritetään 13 sytokiinia: GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13 ja TNF α (Liite 1). Työn koeasetelma kokonaisuudessaan on esitetty kuviossa 1.



KUVIO 1. Työn koeasetelma

5 TYÖN SUORITTAMINEN

Teimme käytännön laboratoriotyön Veripalvelun tiloissa heillä rutiinikäytössä olevilla laitteilla ja välineillä. Reagenssipakkaus ja analysoitavat näytteet hankittiin tätä työtä varten. Ennen työn aloittamista perehdyimme Luminex-menetelmän periaatteisiin ja reagenssipakkauksen työohjeeseen.

5.1 Työprosessin kuvaus

Pyysimme opinnäytetyön aihetta Veripalvelusta, ja saimme ehdotuksen aiheesta syksyllä 2009. Aihe oli mielestämme mielenkiintoinen ja aloitimme tiedonhaun sekä alustavan kirjoitustyön heti marras-joulukuussa. Halusimme heti alussa ymmärtää käyttämämme menetelmän periaatteen, ja saimme siihen perehdytyksen Veripalvelussa. Työssä tarvittavat reagenssit tilattiin Veripalveluun marraskuussa, ja henkilökunta kokeili menetelmää testinäytteillä. Kuudesta perusterveestä henkilöstä otettiin näytteet aamulla sekä iltapäivällä. Testausajon suoritti kokenut Luminex-laitteen käyttäjä. Testin tarkoituksena oli kokeilla reagenssien toimivuutta, ja selvittää kuinka suurta sytokiinipitoisuuksien yksilöllinen vaihtelu on terveillä henkilöillä. Samalla kokeiltiin myös Luminex-laitteelle näitä reagensseja varten luotua ajopohjaa. Reagenssien valmistaja Millipore toimitti Veripalveluun ohjeen ajopohjan luomiseen. Testiajo onnistui ongelmitta, ja sen tuloksissa oli havaittavissa vain pientä henkilökohtaista vaihtelua. Työmme aloittamiselle ei siten ilmennyt esteitä.

Tammikuun alussa tutkittavat potilasnäytteet toimitettiin pakastettuina Kirurgisesta sairaalasta Veripalveluun. Työmme ohjaajat Veripalvelussa olivat valinneet näytteet ja ne oli ryhmitelty valmiiksi kolmeen ryhmään. Aluksi varmistimme, että listalla olevista potilaista löytyi kaikki näytteet. Potilaista oli neljä eri päivinä otettua näytettä (siirtopäivänä (0) sekä 1, 3 ja 7 päivää siirron jälkeen). Osasta potilaista ei kuitenkaan ollut kaikkia näytteitä, ja ne jätimme odottamaan jos viimeiselle kuoppalevyille jäisi tilaa. Reagenssipakkauksen kuoppalevyssä on 96 näytepaikkaa, joista jokaisessa sarjassa 16 menee vakiokuvaajan tekemiseen ja neljä kontrolleille. Käytössämme oli 76 näytepaikkaa jokaisessa sarjassa ja rinnakkaispipetoinnin takia levyille mahtui 38 yksittäistä näytettä. Yhteen sarjaan mahtui siten yhdeksän potilaan neljä näytettä. Valitsimme näytteet niin, että sarjassa oli aina potilaita jokaisesta ryhmästä. Meillä oli 36 potilasta, joista oli kaikki neljä näytettä. Viimeiseen sarjaan otimme viisi potilasta, joista oli vain osa näytteistä.

Aloitimme analysointityön testausajosta jääneellä puolikkaalla reagenssipakkauksella. Siihen mahtui kolmen potilaan näytteet. Testausajon tehnyt henkilö oli apunamme ensimmäisellä kerralla. Hänen avullaan löysimme tarvittavat laitteet ja välineet sekä

saimme hyviä käytännön vinkkejä työn suorittamiseen. Hän perehdytti meitä myös Luminex-laitteen käyttöön ja päivittäisiin huoltotoimenpiteisiin. Ensimmäinen sarja onnistui hyvin, ja sen jälkeen teimme työtä itsenäisesti. Tarkastelimme ensimmäisiä tuloksia ohjaajien kanssa ennen työn jatkamista.

Tämän jälkeen teimme työtä yksi reagenssipakkaus kerrallaan. Suunnittelimme aika-
taulun ottaen huomioon pitkän inkubointiajan sekä Luminex-laitteen päivittäisen rutiini-
käytön. Veripalvelussa on kaksi samanlaista Luminex-laitetta, mutta tarvitsemamme
ajopohja on asennettu vain toiseen niistä. Saimme helposti sovittua laitteen käyttövuoroista
henkilökunnan kanssa. Ohjaajien avulla saimme siirrettyä tulokset Luminex-
laitteelta Excel-muotoon, jossa muokkasimme ne helpommin käsiteltäväksi. Käytimme
Excel-ohjelmaa kuvaajien luomiseen, koska numeerinen tieto oli siinä helposti käsitel-
tävässä muodossa. Tilastollista käsittelyä varten siirsimme tulokset SPSS-ohjelmaan.
Käsittelimme aineistoa sytokiini kerrallaan, toimien aina samalla tavalla.

5.2 Aineisto

Ohjaajamme Veripalvelussa valitsivat työssä määritettävät näytteet. Aineisto koostui
suomalaisista munuaisensiirtopotilaista. Näytteet oli kerätty Kirurgisen sairaalan munu-
aisensiirtopotilailta vuosina 2007 ja 2008. Emme tarvinneet aineiston käyttöä varten
eettisen toimikunnan lupaa, koska näytteet oli kerätty tutkimuskäyttöä varten. Potilaat
oli tässä työssä jaettu kolmeen ryhmään siirteen käynnistymisen mukaan. Yhdellä ryh-
mistä siirre oli käynnistynyt normaalisti, toisella siirre oli käynnistynyt hitaasti ja kol-
mannella oli havaittu siirteen hylkimiseen liittyviä löydöksiä kahden viikon aikana siir-
rosta. Kirurgisen sairaalan klinikot olivat jakaneet potilaat ryhmiin diagnoosin perus-
teella.

Potilaista oli otettu seeruminäytteet siirtopäivänä (0) sekä 1, 3 ja 7 päivää siirron jäl-
keen. Näytteet oli säilytetty pakastimessa (-80°C). Potilasryhmät ovat keskenään eri
kokoiset, koska hyljintään liittyvät löydökset ovat nykyään harvinaisia. Lisäksi kaikista
potilaista ei ollut näytettä jokaisesta aikapisteestä. Taulukossa 1 on esitetty näytteiden
jakautuminen ryhmittäin sekä aikapisteittäin.

TAULUKKO 1. Potilasryhmien esittely.

Ryhmä	0	1	3	7	Potilaita yhteensä
Hyljintään liittyviä löydöksiä	6	6	6	5	6
Siirre käynnistynyt hitaasti (DGF)	16	15	17	17	17
Siirre käynnistynyt normaalisti	18	16	18	18	18
	40	37	41	40	41

5.3 Käytetyt laitteet, välineet ja reagenssit

Tässä työssä käyttämämme laitteet ja välineet ovat Veripalvelun laboratoriossa päivittäisessä käytössä. Opinnäytetyömme ohjaajat Veripalvelussa valitsivat ja tilasivat käytettävät reagenssipakkaukset, ja ne sisälsivät suurimman osan tarvittavista reagensseista. Reagenssien valintaan vaikuttivat erilaiset käytännön syyt, kuten jo käytössä olevat laitteet ja menetelmät sekä laitteiden ohjelmistot. Pakkauksesta puuttuvat reagenssit olivat laboratoriossa rutiinikäytössä ja siten meidän käytettävissä.

Käyttämiamme laitteita olivat tasoravistelijä (IKA-VIBRAX-VXR), sekoittaja (Vortex Genie 2), imulaite (Millipore), sentrifugi (Heraeus Sepatech, Biofuge 15), sonikaattori (Elma[®], Transsonic T460/H), kylmähuone (+4°C), analysaattori (Luminex LABScan[™] 100) ja tietokoneohjelma (Luminex100 IS Software).

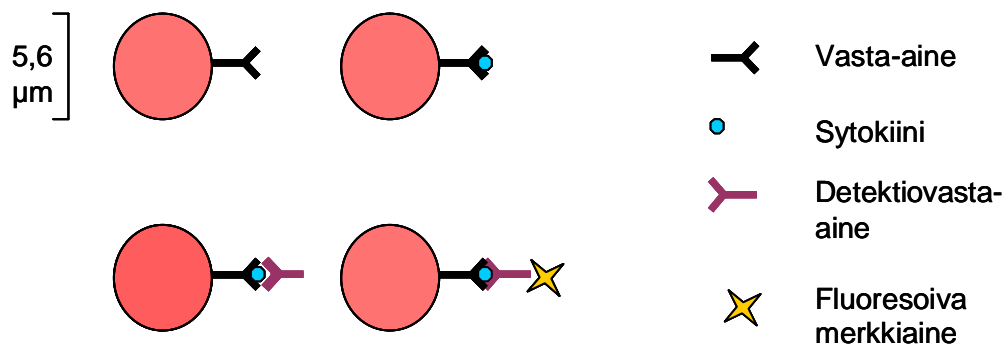
Käyttämiamme välineitä olivat pipetit sekä kärjet sopivilla tilavuuksilla (Biohit), annostelija (Biohit eline[®] Lite Dispenser), tarvittavat laboratorioastiat, 1,5 ml mikroputket, maalariinteippi ja vanupaperi.

Milliporen High Sensitivity Human Cytokine –reagenssipakkaus (sarja 1: LOT 1648761, sarjat 2-5: LOT 1673104, sarjat 1-5: exp 31.1.2011) sisälsi standardin, kontrollit 1 ja 2, seerumi matrix –liuoksen, analyysipuskurin, pesupuskurin, detektiovasta-aineet, Streptavidin-Phycoerythrinin, filterillisen 96 –kuoppalevyn sekä esivalmistetut kuulat. Lisäksi käytimme steriiliä vettä ja analysaattorin vaippanestettä (Luminex[®] xMAP[®] Sheath Fluid, LOT A7279).

5.4 Luminex[®] xMAP[®] -menetelmä

Tässä työssä on käytetty Luminex[®] xMAP[®] -menetelmää, joka mahdollistaa monen analyytin samanaikaisen tutkimisen pienestäkin näytemäärästä. Virtausmittauksen kaltaisessa menetelmässä käytetään halkaisijaltaan 5,6 µm kokoisia kuulia, jotka on

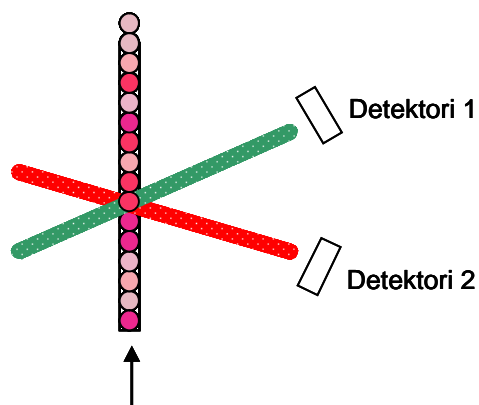
värjätty sisäisesti kahdella fluoresoivalla väriaineella. Näillä punaisen ja infrapunaisen väriaineen vaihtelevilla pitoisuuksilla voidaan luoda 100 toisistaan eroavaa kuularyhmää. Jokainen kuularyhmä voidaan päällystää tarvittavilla reagensseilla, esimerkiksi vasta-aineilla, reseptoreilla, proteiineilla tai oligonukleotideilla. Näytteestä etsitty rakenne sitoutuu päällystetyn kuulan pintaan, jonka jälkeen lisätään detektiovasta-aine. Lopuksi muodostunut kompleksi leimataan fluoresoivalla aineella (Kuvio 1). (Milliporen Milliplex™ MAP High Sensitivity Human Cytokine Kit 2008: 2; About xMAP Technology 2009.)



KUVIO 1. Luminex-menetelmän periaate sytokiinimäärityksessä.

Mittausta varten kuulat ohjataan vaippaliuksen mukana yksitellen lasersäteiden läpi. Laitteessa on kaksi eri aallonpituuksilla toimivaa laseria. Punainen laser (635 nm) mittaa kuulien sisäistä väriä, jolloin selviää kunkin kuulan ryhmä. Vihreä laser (532 nm) mittaa näytteeseen leimatun fluoresenssin.

(Kuvio 2.) Laite laskee kuulia sitä mukaan kun ne ohittavat laserit. Laitteen prosessori tunnistaa kuularyhmän ja siihen sitoutuneet molekyylit samanaikaisesti. Mittaaminen loppuu, kun etukäteen ohjelmoitu minimimäärä kustakin kuularyhmästä on saavutettu, tai jos tarvittavaa kuulamäärää ei saavuteta tietyn ajan kuluessa. (Milliporen Milliplex™ MAP High Sensitivity Human Cytokine Kit 2008: 2; About xMAP Technology 2009.)



KUVIO 2. Luminex-menetelmän mitaus-periaate

5.5 Sytokiinien määrittäminen Luminex-menetelmällä

Käytimme työssä Milliporen Milliplex™ MAP High Sensitivity Human Cytokine -reagenssipakkausta, jolla voidaan mitata samanaikaisesti 13 sytokiinin pitoisuudet:

GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13 ja TNF α (Taulukko 2). Näyttemateriaaliksi soveltuu plasma, seerumi tai solu/kudosviljelmä. (Milplex™ MAP High Sensitivity Human Cytokine kit 2008: 2.)

TAULUKKO 2. Reagenssipakkauksen sytokiinit. (Abbas – Lichtman 2009: 77-78, 123, 253, 258, 270; Kuby 1997: 318-320; Julkunen – Silvennoinen – Hurme 2007: 735.)

Sytokiini	Tuotanto/eritys	Toiminta/tehtävä
IL-1 β	Aktiiviset mononukleaariset fagosyytit	Välittää synnynnäisen immuuniteetin tulehdusreaktioita sekä houkuttelee tulehduspaikalle neutrofiilejä ja monosyyttejä.
IL-2	Aktiiviset T-solut	Autokriininen vaikutus lisää T-solujen lisääntymistä ja kasvua. Tarvitaan T-soluvälitteisen immuunireaktion säätelyssä. Stimuloi myös NK-solujen ja B-solujen lisääntymistä sekä erilaistumista.
IL-4	CD4-positiiviset Th2-solut	Lisää naiivien CD4+ T-auttajasolujen erilaistumista Th2 suuntaan. Stimuloi B-solujen IgE-tuotantoa. Anti-inflammatorinen.
IL-5	CD4-positiiviset Th2-solut sekä aktiiviset syöttösolut	Stimuloi eosinofiilien kasvua sekä erilaistumista ja aktivoi kypsiä eosinofiilejä.
IL-6	Mm. aktiiviset mononukleaariset fagosyytit, endoteelisolut, fibroblastit	Stimuloi akuutin faasin proteiinien synteesiä sekä vasta-aineita tuottavien B-lymfosyyttien kasvua.
IL-7	Luuytimen strooman solut	Ylläpitää ja kasvattaa T- ja B-solujen esiasteiden lukumäärää.
IL-8	Makrofagit, endoteelisolut	Kemotaktinen, lisää neutrofiilien määrää tulehduspaikalla.
IL-10	Aktiiviset makrofagit ja T-auttajasolut	Estää Th1-solujen sytokiinituotantoa, anti-inflammatorinen.
IL-12(p70)	Mononukleaariset fagosyytit ja dendriittisolut	Aktivoi NK-soluja, lisää NK-solujen sekä T-solujen IFN γ -tuotantoa. Lisää Th1-solujen erilaistumista sekä NK-solujen ja sytotoksisten T-solujen sytolyyttistä aktiivisuutta.
IL-13	T-auttajasolut (Th2)	Estää makrofagien aktivaatiota sekä inflammatoristen sytokiinien eritystä. Säätelee tulehdusreaktiota.
GM-CSF	Aktiiviset T-solut, makrofagit, endoteelisolut, luuytimen strooman solut	Lisää neutrofiilien ja monosyyttien kasvua sekä erilaistumista.
IFN γ	T-lymfosyytit ja NK-solut	Aktivoi makrofageja sekä luonnollisessa että soluvälitteisessä immuunireaktiossa. Estää Th2-solujen kasvua.
TNF α	Aktiiviset mononukleaariset fagosyytit	Lisää neutrofiilien ja monosyyttien liikkumista tulehduspaikalle (proinflammatorinen). Lisää makrofagien ja endoteelisolujen kemokiinieritystä.

Aloitimme sytokiinipitoisuuksien määrittämisen ottamalla reagenssipakkauksen huoneenlämpöön noin 30 minuuttia ennen työn aloittamista. Tänä aikana sulatimme, sekoitim-

me ja sentrifugoimme (10 min, 10 000 rpm) seeruminäytteet. Laimensimme pesupuskurin ja liuotimme pakastekuivatut standardit, kontrollit sekä seerumi matrixin ohjeen mukaan steriiliin veteen. Vakiokuvaajaa varten teimme laimennussarjan 1,5 ml mikroputkiin (2 000, 400, 80, 16, 3,2, 0,64 ja 0,13 pg/ml).

Esikastelimme kuoppalevyn pesupuskurilla, jonka jälkeen imimme nesteen filteripohjan läpi. Seuraavaksi lisäsimme kuoppalevylle kuulaliuoksen. Olimme ensin sonikoineet ja sekoittaneet liuoksen huolellisesti, jotta se olisi mahdollisimman homogeeninen ja kuulat olisivat irrallaan toisistaan. Käytimme kuulien lisäämiseen annostelijaa, jotta pipetointitarkkuus olisi mahdollisimman hyvä. Varmistimme kuulien tasaisen jakautumisen sekoittamalla kuulaliuosta myös pipetoinnin aikana.

Aloitimme pipetoinnin standardien ja kontrollien lisäämisellä niille määrättyihin kaivoihin. Päälle lisäsimme seerumi matrix -liuosta, joka muuttaa standardien ja kontrollien koostumuksen seerumia vastaavaksi. Laitoimme kaikkiin näytekaivoihin ensin analyysipuskuria ja sitten seeruminäytettä. Pipetoimme kaikki standardit, kontrollit ja näytteet rinnakkaisina. Peitimme kuoppalevyn ja laitoimme sen inkuboitumaan tasoravistelijalla yön yli (16-18 tuntia) kylmähuoneessa +4°C:ssa. Inkuboinnin aikana näytteissä olevat sytokiinit kiinnittyvät vasta-aineilla päällystettyjen kuulien pintaan.

Poistimme nesteen kaivoista imulaitteella ja pesimme kaivot pesupuskurilla kaksi kertaa. Tämän jälkeen lisäsimme niihin detektiovasta-aineet, ja levyä inkuboitiin yhden tunnin ajan tasoravistelijalla huoneenlämmössä. Detektiovasta-aineet tarttuvat sytokiineihin, jotka ovat kiinnittyneet kuulien pintaan. Seuraavaksi lisäsimme kaivoihin Strep-tavidin-Phycoerythrinia, joka on fluoresoiva merkkiaine ja kiinnittyy detektiovasta-aineisiin. Peitimme kuoppalevyn ja sitä inkuboitiin 30 minuutin ajan tasoravistelijalla huoneenlämmössä.

Poistimme nesteen imulaitteella ja pesimme kuten edellä. Sen jälkeen lisäsimme vaipanestettä, ja sekoitimme kuulat irti kaivon seinämistä tasoravistelijalla. Ohjeesta poiketen, siirsimme nesteet kaivoista toiselle kuoppalevylle. Tämä vaihe oli tarpeellinen, koska reagenssipakkauksen levyä ei olisi voinut laittaa Veripalvelun analysaattoriin ilman neulan korkeuden säätöä. Tämä toimenpide olisi aiheuttanut haittaa laitteen muille käyttäjille. Siirron jälkeen sekoitimme levyä 15-20 sekuntia, ja asetetimme sen analysaattoriin ajoa varten. Viimeisen inkuboinnin aikana varmistimme että analysaattori on käyttövalmis oikeaan aikaan. Liitteenä 2 on reagenssipakkauksen työohje.

Käytimme tulosten analysointiin Milliporen toimittamaa ajopohjaa, johon on ohjelmoitu vakiokuvaajan muodostaminen laimennussarjasta mitattujen fluoresenssien avulla. Ohjelma tulkitsee vakiokuvaajalta näytteiden fluoresenssin sytokiiniipitoisuudeksi (pg/ml).

6 TULOKSET

Tämän työn tavoitteena oli tarkastella potilaan sytokiiniiprofiilin merkitystä munuaissiirteen käynnistymisessä. Tarkoituksena oli selvittää onko munuaissiirteen normaalin ja hitaan käynnistymisen sekä hyljinnän välillä eroja potilaiden sytokiiniipitoisuuksissa. Ryhmien välisiä tuloksia tarkasteltiin neljässä eri aikapisteessä (siirtopäivänä (0) sekä 1, 3 ja 7 päivää siirron jälkeen). Samalla seurattiin myös ryhmänsisäistä sytokiiniipitoisuuksien vaihtelua aikapisteiden välillä.

6.1 Tulosten tilastollinen tarkastelu

Sytokiiniipitoisuuksien lineaarisuus on vakiokuvaajan mukaan 0,13 – 2000 pg/ml. Tuloksia käsiteltäessä sen alittavat pitoisuudet jäivät huomiotta ja sen ylittävät tulokset merkitsimme yhtä suureksi kuin 2000 pg/ml. Alarajan alittavia tuloksia esiintyi vain niissä sytokiineissa joiden pitoisuustaso oli hyvin matala kaikissa näytteissä. Niillä tuloksilla ei siten ollut merkitystä työssämme. Huomioimme ylärajan ylittävät tulokset, koska hyvin korkeat pitoisuudet ovat harvinaisia, ja siksi merkityksellisiä tämän työn kannalta. Muutamia määriksi epäonnistui vähäisen kuulumäärän johdosta, ja nämä tulokset jäivät huomioimatta niiden epäluotettavuuden takia. Kaikista näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaismääritystä, ja tuloksia käsitellessämme käytimme niiden keskiarvoja. Toisen rinnakaistuloksen puuttuessa edellä mainituista syistä, käytimme saatavilla olevaa tulosta.

Analysoimme tuloksia SPSS-ohjelmalla. Tulosten käsittelyssä käytimme parametrittomia menetelmiä aineiston pienen koon vuoksi. Kruskalin-Wallis -testi soveltuu usean erikokoisen ryhmän vertailuun. Sen avulla selvitimme onko kolmen potilasryhmän tulosten välillä tilastollisesti merkitseviä eroja. Mannin-Whitney U-testiä käytetään kahden riippumattoman keskiarvon vertailuun, ja sillä tarkastelimme ryhmien välisiä tuloksia pareittain. Friedmanin testiä voi käyttää silloin kun kohdevaikutuksia on kolme tai enemmän. Sen avulla selvitimme onko ryhmän sisällä sytokiiniipitoisuuksissa tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteiden välillä. Wilcoxonin testillä arvioidaan parittaisten mittauksien välisten erojen tilastollista merkitsevyyttä. Käytimme sitä kahden perättäisen aikapisteen välisten tilastollisesti merkitsevien erojen tarkasteluun. (Metsämuuro-

nen 2004: 9, 21, 100, 113, 181, 195.) Aineiston käsittelyssä tilastollisesti merkitseviksi tuloksiksi luokiteltiin ne, joiden merkitsevyysluku (p) oli pienempi kuin 0,05. Määrittelyissä pitoisuuksissa esiintyi yksittäisiä poikkeavia tuloksia, joten käytimme kuvaajien luomisessa mediaania. Siinä yksittäisellä suurella näytepitoisuudella ei ole yhtä suurta painoarvoa kuin keskiarvossa.

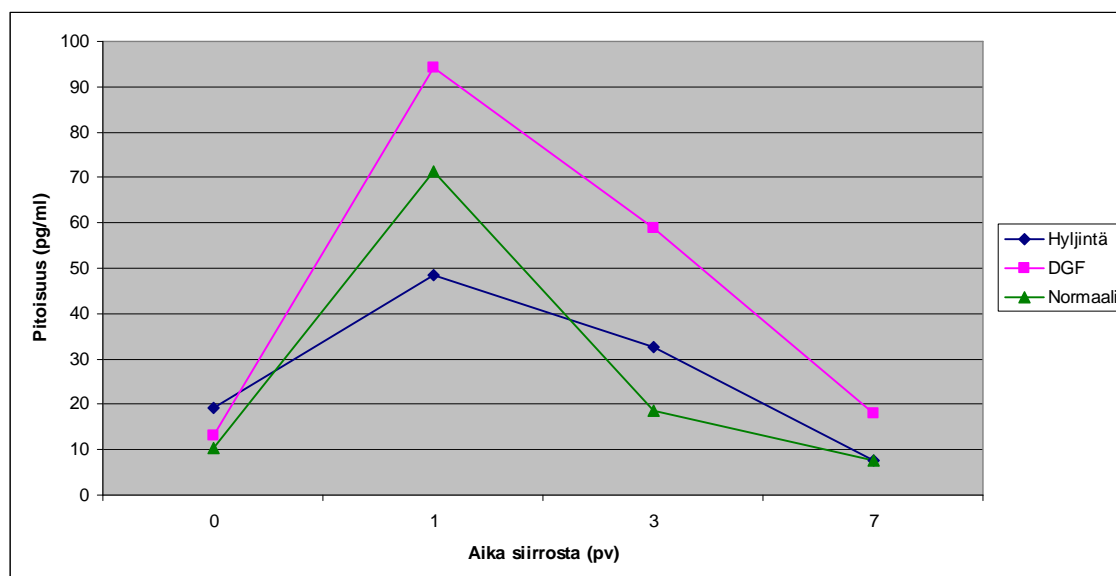
6.2 Sytokiinipitoisuuksien erot potilasryhmien ja aikapisteiden välillä

Kahdeksan sytokiiniin (GM-CSF, IFN γ , IL-12(p70), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, ja IL-13) pitoisuudet olivat kaikilla potilailla hyvin alhaiset (Liite 3). Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja eri aikapisteissä. Pitoisuuksissa ei myöskään ollut tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteiden välillä yhdessäkään ryhmässä. IL-2:n ja IL-4:n tuloksissa esiintyi yksittäiset pienet merkitsevyysluvut (p=0,028 ja p=0,024). Mielestämme niillä ei kuitenkaan ole merkitystä tämän työn kannalta näiden sytokiinien pitoisuuksien alhaisen tason vuoksi. Tämän työn perusteella potilasryhmiä ei ole mahdollista erottaa toisistaan näiden kahdeksan sytokiiniin pitoisuuden perusteella, ja siten niitä ei voi käyttää munuaisiirteiden käynnistymisen seurantaan.

Potilasryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja IL-6 -pitoisuuksissa. Kaikissa ryhmissä kuitenkin oli tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteiden välillä. Hyljintäryhmässä oli tilastollisesti merkitsevä ero aikapisteiden 0 ja 1 välillä. DGF-ryhmässä oli tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteiden 0 ja 1 sekä 3 ja 7 välillä. Normaaliryhmässä oli tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteiden 0 ja 1 sekä 1 ja 3 välillä (Taulukko 3). Munuaisensiirron jälkeen IL-6:n erittyminen lisääntyi kaikissa ryhmissä heti siirron jälkeen ja laski viikon kuluessa (Kuvio 4). IL-6 -pitoisuuden nousu ja lasku tapahtuivat kaikilla ryhmillä samansuuntaisesti, ja yksittäisten potilasnäytteiden tulokset olivat samalla tasolla kaikissa ryhmissä (Liite 4). Näin ollen IL-6 -pitoisuuksilla ei voi erottaa potilasryhmiä toisistaan, eikä se siten toimi munuaisiirteiden käynnistymisen seurannassa.

TAULUKKO 3. IL-6 -pitoisuuksien aikapisteiden välisten muutosten merkitsevyysluvut käyttäen Friedmanin ja Wilcoxonin testejä.

Ryhmä	Hyljintä	DGF	Normaali
Kaikki aikapisteet, p=	0,041	0,000	0,000
Aikapisteet 0 - 1, p=	0,028	0,001	0,000
Aikapisteet 1 - 3, p=	0,173	0,163	0,012
Aikapisteet 3 - 7, p=	0,138	0,031	0,435



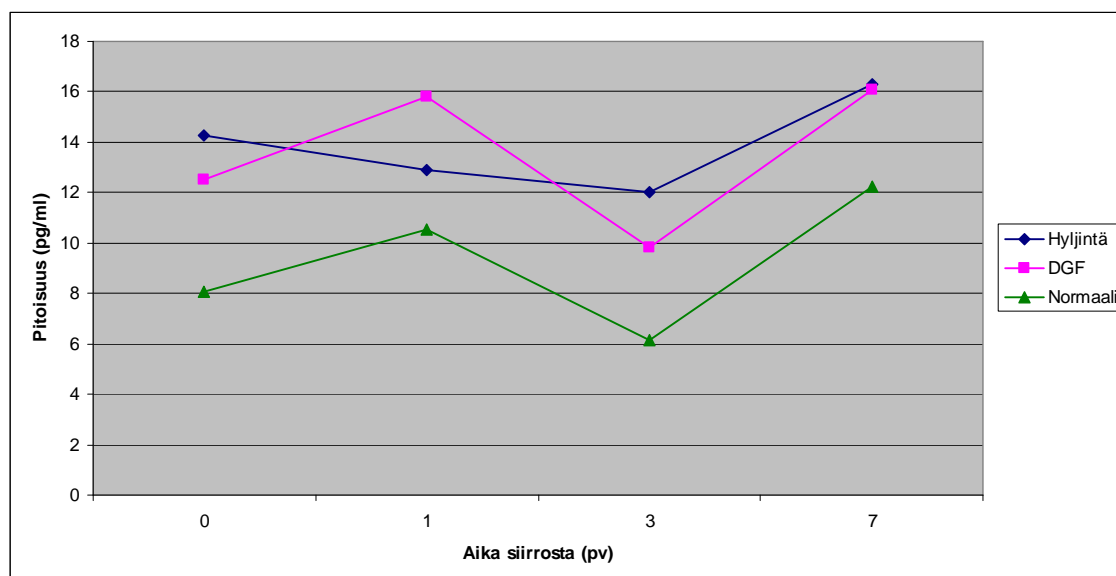
KUVIO 4. IL-6 ryhmien mediaanit aikapisteittäin.

IL-7:n pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitseviä eroja kolmen potilasryhmän välillä aikapisteessä 3 ($p=0,027$). Tarkasteltaessa ryhmiä pareittain, hyljintä- ja DGF-ryhmän välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Hyljintä- ja normaaliryhmän ($p=0,040$) sekä DGF- ja normaaliryhmän ($p=0,019$) välillä aikapisteessä 3 oli tilastollisesti merkitsevää eroa.

IL-7:n pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitsevä ero aikapisteiden välillä DGF-ryhmässä ja normaaliryhmässä. DGF-ryhmässä tilastollisesti merkitseviä eroja oli aikapisteiden 0 ja 1 sekä 1 ja 3 välillä. Normaaliryhmässä tilastollisesti merkitseviä eroja oli kaikkien aikapisteiden välillä (Taulukko 4). DGF- ja normaaliryhmissä IL-7:n pitoisuus nousi siirron jälkeisenä päivänä, jonka jälkeen se laski kolmanteen päivään mennessä ja nousi jälleen seitsemäntenä päivänä (Kuvio 5). Potilasryhmiä ei siten voi erottaa pitoisuuksien aikapisteiden välisten muutosten perusteella.

TAULUKKO 4. IL-7 -pitoisuuksien aikapisteiden välisten muutosten merkitsevyysluvut käyttäen Friedmanin ja Wilcoxonin testejä.

Ryhmä	Hyljintä	DGF	Normaali
Kaikki aikapisteet, $p=$	0,724	0,010	0,001
Aikapisteet 0 - 1, $p=$	0,345	0,017	0,026
Aikapisteet 1 - 3, $p=$	0,917	0,039	0,002
Aikapisteet 3 - 7, $p=$	0,686	0,554	0,002



KUVIO 5. IL-7 ryhmien mediaanit aikapisteittäin.

Liitessä 4 on kuvaajat kaikkien potilasnäytteiden IL-7 -pitoisuuksista, joista käy ilmi hyljintä-, DGF- ja normaaliryhmien yhtäläisyydet ja eroavaisuudet. Kuvaajista huomaa, että kaikkien ryhmien pitoisuudet olivat suurin piirtein samaa tasoa, lukuunottamatta DGF-ryhmän muutamaa korkeampaa tulosta. Ryhmien välillä kuitenkin oli tilastollisesti merkitsevä ero, ja siten IL-7 voi pitää mahdollisena seurantatutkimuksena.

IL-8 -pitoisuuksissa kolmen ryhmän välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteissä 3 ja 7. Parittaisessa tarkastelussa hyljintä- ja DGF-ryhmän välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Hyljintä- ja normaaliryhmän välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteissä 3 ja 7. DGF- ja normaaliryhmän välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero vain aikapisteessä 3 (Taulukko 5).

TAULUKKO 5. IL-8:n merkitsevyysluvut ryhmien välillä eri aikapisteissä käyttäen Kruskalin-Wallis -testiä ja Mannin-Whitneyn U-testiä.

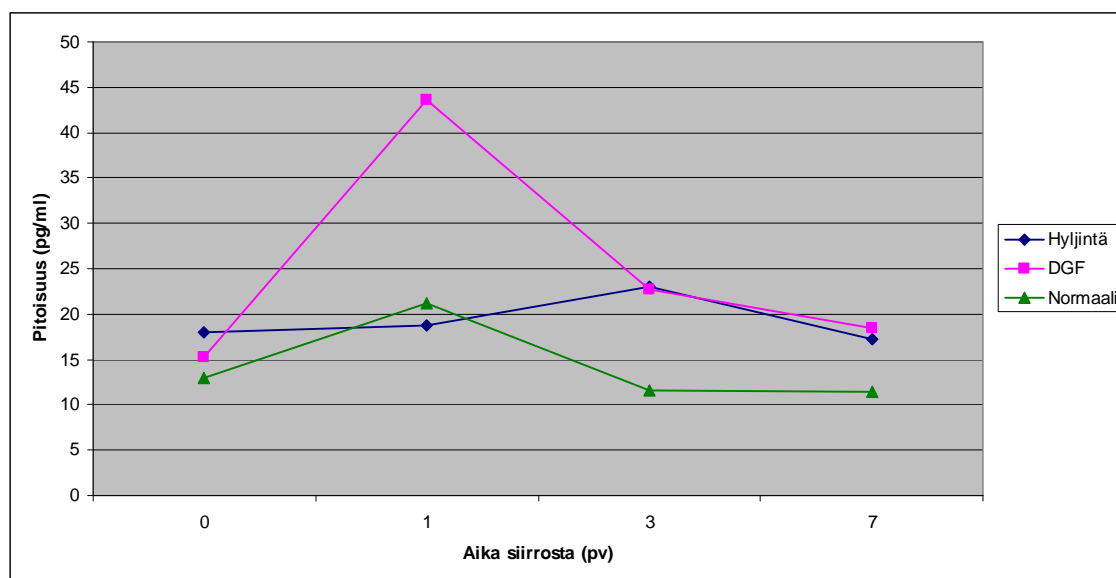
Aikapiste	0	1	3	7
Kaikki ryhmät, p=	0,285	0,166	0,015	0,046
Hyljintä / DGF, p=	0,340	0,231	0,973	0,543
Hyljintä / normaali p=	0,156	0,858	0,027	0,024
DGF / normaali p=	0,401	0,080	0,009	0,067

Aikapisteiden välillä IL-8:n pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitsevä ero DGF- ja normaaliryhmässä. DGF-ryhmässä tilastollisesti merkitseviä eroja oli kaikkien aikapisteiden välillä. Normaaliryhmässä tilastollisesti merkitseviä eroja oli aikapisteiden 0 ja 1 sekä 1 ja 3 välillä (Taulukko 6). Kuviossa 6 näkyy pitoisuuksien muutosten suunta. Kai-

kissa ryhmissä IL-8:n pitoisuuksien mediaanit olivat korkeimmillaan siirron jälkeisenä päivänä, ja laskivat viikon kuluessa. Pitoisuuksien muutokset tapahtuivat normaali- ja DGF-ryhmissä samansuuntaisesti.

TAULUKKO 6. IL-8 -pitoisuuksien aikapisteiden välisten muutosten merkitsevyyshluvut käyttäen Friedmanin ja Wilcoxonin testejä.

Ryhmä	Hyljintä	DGF	Normaali
Kaikki aikapisteet, p=	0,896	0,001	0,000
Aikapisteet 0 - 1, p=	0,249	0,001	0,002
Aikapisteet 1 - 3, p=	0,917	0,003	0,000
Aikapisteet 3 - 7, p=	0,686	0,039	0,231



KUVIO 6. IL-8 ryhmien mediaanit aikapisteittäin.

Liitteessä 4 on kaikkien potilasnäytteiden IL-8 -pitoisuuksien kuvaajat, jotka tukevat tilastollisten menetelmien antamia tuloksia. Liitteen kuvaajia sekä kuviota 6 tarkastelemalla voidaan todeta, että DGF-ryhmän pitoisuudet olivat keskimäärin korkeampia kuin normaaliryhmän tulokset. Tämän työn perusteella IL-8 voisi olla käyttökelpoinen sytokiini munuaisensiirtojen käynnistymisen seurannassa.

IL-10 -pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitseviä eroja kolmen potilasryhmän välillä aikapisteissä 0 ja 3. Tarkasteltaessa ryhmiä pareittain hyljintä- ja DGF-ryhmän välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Hyljintä- ja normaaliryhmän välillä ero oli tilastollisesti merkitsevä vain aikapisteessä 0. DGF- ja normaaliryhmän välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteissä 0, 1 ja 3 (Taulukko 7).

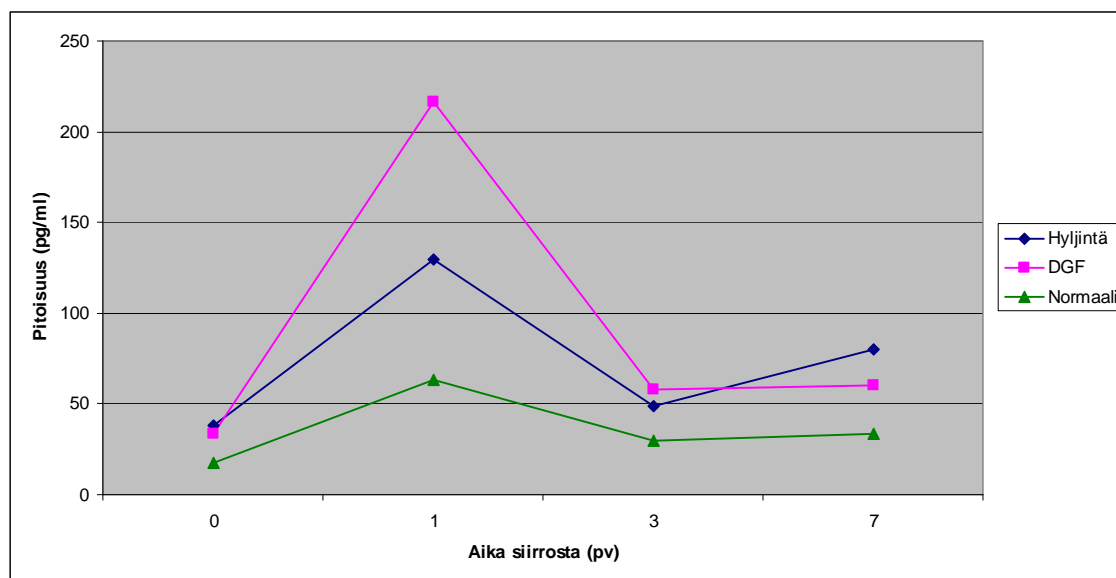
TAULUKKO 7. IL-10:n merkitsevyysluvut ryhmien välillä eri aikapisteissä käyttäen Kruskalin-Wallis -testiä ja Mannin-Whitneyn U-testiä.

Aikapiste	0	1	3	7
Kaikki ryhmät, p=	0,011	0,057	0,015	0,419
Hyljintä / DGF, p=	0,677	0,294	0,759	0,401
Hyljintä / normaali p=	0,022	0,261	0,077	0,325
DGF / normaali p=	0,008	0,023	0,005	0,386

IL-10:n pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitsevä ero aikapisteiden välillä DGF- ja normaaliryhmässä. Kaikissa ryhmissä oli tilastollisesti merkitsevä ero aikapisteiden 0 ja 1 sekä 1 ja 3 välillä. (Taulukko 8). IL-10:n pitoisuus nousee jyrkästi heti siirron jälkeen ja laskee viikon aikana lähelle lähtötasoa (Kuvio 7).

TAULUKKO 8. IL-10 -pitoisuuksien aikapisteiden välisten muutosten merkitsevyysluvut käyttäen Friedmanin ja Wilcoxonin testejä.

Ryhmä	Hyljintä	DGF	Normaali
Kaikki aikapisteet, p=	0,062	0,000	0,001
Aikapisteet 0 - 1, p=	0,028	0,001	0,000
Aikapisteet 1 - 3, p=	0,028	0,003	0,008
Aikapisteet 3 - 7, p=	0,345	0,177	0,071



KUVIO 7. IL-10 ryhmien mediaanit aikapisteittäin.

Kaikkien potilasnäytteiden IL-10 -pitoisuuskuvaajien (Liite 4) mukaan DGF-ryhmän sytokiiniipitoisuudet olivat korkeampia kuin hyljintä- ja normaaliryhmien pitoisuudet. Tämän työn perusteella IL-10 -pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitsevä ero DGF- ja

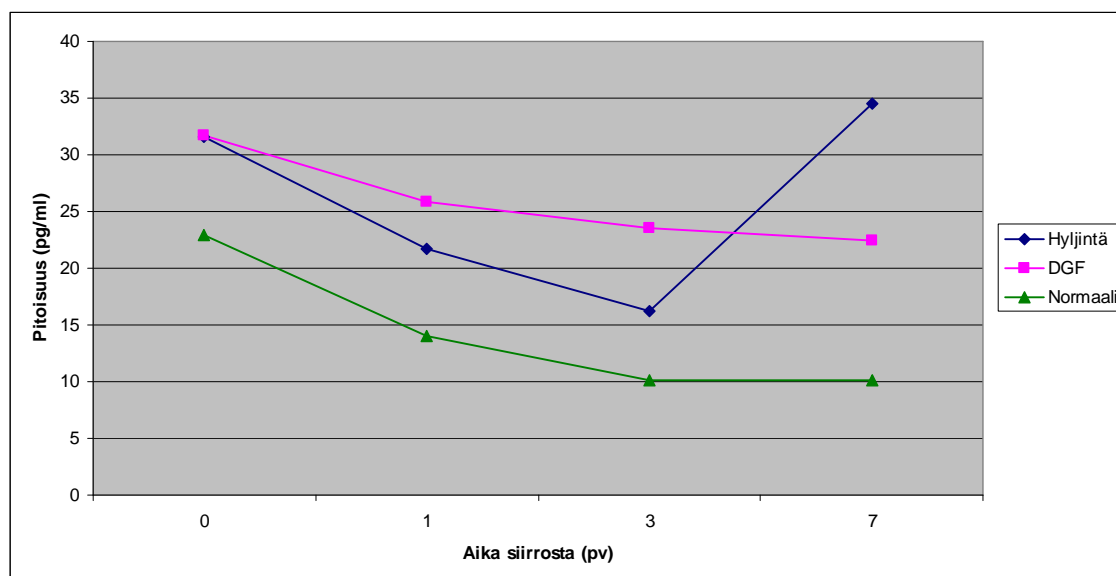
normaaliryhmän välillä. Siten IL-10 on mahdollinen munuaisensiirtojen seurantasytokiini.

TNF α :n pitoisuuksissa oli kolmen ryhmän välillä tilastollisesti merkitsevä ero aikapisteissä 3 ja 7. Parittain tarkasteltuna hyljintä- ja DGF-ryhmän välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Hyljintä- ja normaaliryhmän välillä ero oli tilastollisesti merkitsevä aikapisteissä 3 ja 7. DGF-ryhmän ja normaaliryhmän välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero aikapisteissä 1, 3 ja 7. (Taulukko 9). TNF α :n pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitsevä ero aikapisteiden välillä vain normaaliryhmässä, aikapisteiden 0 ja 1 välillä ($p=0,002$).

TAULUKKO 9. TNF α , merkitsevyyssluvut ryhmien välillä eri aikapisteissä käyttäen Kruskalin-Wallisin -testiä ja Mannin-Whitneyn U-testiä.

Aikapiste	0	1	3	7
Kaikki ryhmät, $p=$	0,591	0,066	0,012	0,032
Hyljintä / DGF, $p=$	0,910	0,693	0,516	0,319
Hyljintä / normaali $p=$	0,454	0,294	0,047	0,046
DGF / normaali $p=$	0,401	0,019	0,006	0,035

TNF α :n pitoisuuksia tarkastellessa havaitaan, että normaaliryhmän pitoisuudet olivat alhaisempia kuin DGF- ja hyljintäryhmän (Kuvio 8). Erot DGF- ja normaaliryhmän välillä olivat myös tilastollisesti merkitseviä. Aikapisteiden välillä ei ollut muita tilastollisesti merkitseviä eroja pitoisuuksissa kuin normaaliryhmän pitoisuuksien lasku. Liitteen 4 kuvaajia tarkastelemalla havaitaan, että vain normaaliryhmän tulokset käyttäytyivät lähes samalla tavalla, suunta oli yleisesti laskeva ja taso jäi matalaksi. DGF- ja hyljintäryhmien tulokset olivat vaihtelevia, mutta taso oli yleisesti korkeampi kuin normaaliryhmällä. Tämän työn perusteella TNF α on myös mahdollinen munuaisensiirtojen seurantasytokiini.



KUVIO 8. TNF α ryhmien mediaanit aikapisteittäin.

6.3 Tulosten yhteenveto ja johtopäätökset

Tässä työssä tarkastelluista 13 sytokiinista mahdollisia munuaissiirteen seuraantaan sopivia sytokiineja ovat IL-7, IL-8, IL-10 ja TNF α . IL-7 on kasvutekijä, joka toimii välittäjänä leukosyyttien erilaistumisessa. Se stimuloi luuytimen kantasoluista lymfosyytilinjan solujen lisääntymistä sekä kypsymistä. (Abbas 2009: 77-78.) Makrofagien erittämän IL-8:n vaikutuskohde on neutrofiilit. Sen päätehtävä on kemotaksis eli se helpottaa leukosyyttien kiinnittymistä verisuonten pintaan ja niiden kulkeutumista verisuonen seinämän läpi tulehduspaikalla. IL-10 on tärkeä anti-inflammatorinen sytokiini, jota erittävät monosyytit sekä lymfosyytit. Se vaikuttaa estämällä tulehdusta lisäävien sytokiinien (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α ja GM-CSF) erittymistä. (Kuby 1997: 319, 327, 367.) TNF α stimuloi akuutin faasin reaktiota ja sitä erittävät monet solutyypit, esimerkiksi makrofagit (Abbas 2009: 30-31, 38).

Siirtopäivänä (0) otetuista näytteistä pystyi erottamaan ryhmät toisistaan vain IL-10:n pitoisuuksissa. Tämä tilastollinen ero merkitsee sitä, että IL-10 -pitoisuudella voisi olla mahdollista ennustaa siirteen käynnistymistä jo ennen siirtoa otetusta näytteestä. Pitoisuuserojen kuitenkin ollessa näin pieniä (mediaanien erotus noin 20 pg/ml) on tuloksiin suhtauduttava varauksella.

Aikapisteessä 1 normaali- ja DGF-ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja IL-10:n sekä TNF α :n pitoisuuksissa. Aikapisteessä 3 näiden ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja kaikissa neljässä sytokiinissa (IL-7, IL-8, IL-10 ja TNF α) ja aikapisteessä 7 vain TNF α :n pitoisuuksissa. Näin ollen aikapisteessä 3 oli parhaiten havaittavissa tilastollisesti merkitseviä eroja normaali- ja DGF-ryhmien välillä. Hyljintäryhmän

pienen koon vuoksi sen luotettava vertailu muihin ryhmiin on kyseenalaista. Tämän työn perusteella emme siis pysty vakuuttavasti erottamaan sitä muista ryhmistä.

Kolmen sytokiinin (IL-7, IL-8 ja IL-10) pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitseviä eroja aikapisteiden välillä DGF- ja normaaliryhmissä. Pitoisuuksien muutokset ryhmien sisällä tapahtuivat siten samansuuntaisesti aikapisteiden välillä. Siirtopotilaan seurannassa voisi siten saada hyödyllistä tietoa myös pitoisuuksien muutosten suuntaa tarkkailemalla.

Sytokiinit toimivat verkostomaisesti ja usein päällekkäin, joten yhden yksittäisen sytokiinin vaikutusta munuaissiirteen käynnistymiseen voi olla vaikea määrittää. Neljän sytokiinin (IL-7, IL-8, IL-10 ja TNF α) pitoisuuksien yhtäaikainen tarkastelu voisi antaa parhaimman kuvan munuaissiirteen käynnistymisestä.

7 TULOSTEN LUOTETTAVUUS

Tutkimuksen valideetti tarkoittaa sen kykyä mitata sitä, mitä oli tarkoitus mitata. Sitä alentavat systemaattiset virheet, jotka vaikuttavat koko aineistoon. Reliabiliteetti tarkoittaa tutkimustulosten pysyvyyttä mittauksesta toiseen, ja sitä alentavat satunnaisvirheet. (Heikkilä 1998: 178–179.) Tässä työssä sekä valideetti että reliabiliteetti ovat alentuneet. Tulosten rinnakkaismääritykset poikkesivat toisistaan, joten on vaikea arvioida pitoisuuksien todellista tasoa koko aineistossa. Lisäksi tästä syystä aineistossa saattaa esiintyä myös yksittäisiä poikkeavia tuloksia. Olemme kuitenkin toiminnallamme minimoineet muut kuin menetelmästä johtuvat virhetekijät, ja siten parantaneet työmme luotettavuutta.

Tarkkailimme tulosten luotettavuutta käyttämällä jokaisessa sarjassa reagenssien valmistajan kahta eritasoista kontrollia (QC-1 ja QC-2). Olemme koonneet liitteen 5 kuviin kaikkien kontrollien rinnakkaistulokset sekä tavoitearvot. Kontrollien tulosten sijoittuminen tavoitearvojen väliin vaihteli. Ongelmia oli sekä rinnakkaistulosten suuressa vaihtelussa että tulosten sijoittumisessa tavoitearvojen yläpuolelle. Liuotimme kylmäkuivatut kontrollit ohjeen mukaisesti jokaista sarjaa varten samalla tavalla. Lisäksi sarjat analysoitiin aina samalla tavalla, joten työskentelymme ei selitä kontrollien ongelmia. Keskustelussa ohjaajien kanssa todettiin, että menetelmän luonne ja kontrollien laatu voivat osaltaan selittää kontrollien tuloksia. Kontrollien epätasaisuus kuitenkin alentaa työn tulosten luotettavuutta.

Työmme kaikki näytteet määritettiin kahtena rinnakkaisena, tällä lisättiin yksittäisen näytteen tuloksen luotettavuutta. Rinnakkaismääritysten välillä oli kuitenkin suuria eroja. Keskustelimme ongelmasta ohjaajien kanssa, ja totesimme näiden lukujen keskiarvon antavan meille käyttökelpoisen pitoisuustason. Ohjaajien mukaan rinnakkaistulosten suuri vaihtelu liittyy menetelmän luonteeseen, sillä onkin tarkoitus tarkkailla pitoisuustasojen muutoksia, eikä varsinaisesti määrittää absoluuttisia pitoisuuksia.

Tulosten käsittelyä varten jouduimme siirtämään numeerista tietoa ohjelmasta toiseen. Tällaisessa toiminnassa on suurena riskinä se, että tietoa tulee kopioitua väärin. Tämän välttämiseksi olemme toimineet huolellisesti ja järjestelmällisesti sekä tarkastaneet tulokset aina siirron jälkeen.

Toimimme hyvien laboratoriokäytäntöjen mukaisesti noudattaen tarvittavaa aseptiikkaa. Säilytimme reagenssipakkauksia ohjeiden mukaisesti, ja lisäksi varmistimme reagenssien voimassaolon aina ennen työn suorittamista. Pakastimessa säilytetyt näytteet sulatettiin ainoastaan analysointia varten. Lisäksi kaikkien näytteiden käsittely tapahtui aina samalla tavalla.

Laboratoriotyöskentelyämme ohjasi Luminex-laitetta pitkään käyttänyt laboratoriohjaaja, joka oli myös koekäyttänyt tässä työssä käytettävän reagenssipakkauksen. Tämä lisäsi työskentelyvarmuuttamme, ja saimme paljon hyviä käytännön neuvoja. Ohjaajan avulla pystyimme myös suunnittelemaan sujuvan työskentelyrytmin, ja maksimoimaan työskentelyn samankaltaisuuden sarjasta toiseen. Pientä vaihtelua voi kuitenkin esiintyä kahden eri henkilön tehdessä työtä. Toisaalta kahden henkilön tarkastama toiminta lisää luotettavuutta.

8 POHDINTA

Työmme tavoitteena oli selvittää voiko sytokiinipitoisuuksien muutoksia tarkastelemalla saada tietoa munuaissiirteen käynnistymisestä tai siihen liittyvistä ongelmista. Tavoitteena oli etsiä uutta menetelmää munuaisensiirtopotilaiden seurantaan leikkauksen jälkeen. Sytokiinien määrittäminen seerumista olisi erityisen hyvä menetelmä, sillä verinäytteen ottaminen siirtopotilaalta onnistuu aina. Virtsa ei välttämättä erityy kaikilta heti leikkauksen jälkeen ja biopsian käyttö on ongelmallista komplikaatoriskien takia. Näin ollen verinäyte olisi paras näytemuoto. Lisäksi usean sytokiinin samanaikaisella määrittelyksellä yhdestä näytteestä voidaan saada paljon tietoa siirteen käynnistymisestä.

Teoriaosuudessa esitellyt artikkelit tukevat tässä työssä saatuja tuloksia. Aikaisemmista tutkimuksista käy ilmi, että elinsiirtojen yhteydessä on havaittu sytokiinipitoisuuksissa eroja erilaisen kliinisen kuvan omaavien potilasryhmien välillä. Myös tässä aineistossa saatiin esille tilastollisesti merkitseviä eroja potilasryhmien välillä. Saamiamme tuloksia ei kuitenkaan suoraan voi verrata aikaisempiin tutkimuksiin, koska tällaisella aineistolla ei ole tehty vastaavaa tutkimusta. Tutkimuksissa on keskitytty yleensä hyljintään, eikä munuaissiirteen hidasta käynnistymistä ole tutkittu erikseen. Tässä työssä on uutta se, että näytteitä on kerätty tutkimustarkoitukseen siirron jälkeen järjestelmällisesti tiettyinä päivinä tietämättä miten siirre käynnistyy.

Tämän työn perusteella emme pystyneet erottamaan hyljintäryhmää muista ryhmistä. Alusta lähtien tiesimme, että ryhmän pieni koko ($n=6$) tulee vaikeuttamaan tilastollisesti merkitsevien tulosten saamista. Tutkimusjoukon ollessa näin pieni, ei sattumanvaraisuutta voida sulkea pois. Lisäksi hyljintä alkaa yleensä viiveellä, eikä heti siirron jälkeen. Koska työssä käsitellyt näytteet oli otettu enintään viikko siirron jälkeen, olisi ollut epätodennäköistä löytää hyljintään liittyviä muutoksia. Hyljintä on nykyään niin harvinaista, että nämä kuusi hyljintäpotilasta olivat ainoat vuosina 2007–2008 kerätystä aineistosta. Mahdollisissa jatkotutkimuksissakaan ei siten pystytä keräämään merkittävästi suurempaa hyljintäryhmää.

Työmme näytteet oli kerätty tiettyinä päivinä siirron jälkeen. Olemme tarkastelleet pitoisuuksien muutoksia näiden aikapisteiden välillä, mutta emme tietenkään voi tietää miten pitoisuudet käyttäytyvät niiden välillä. Pitoisuuksien huiput eivät todellisuudessa siten välttämättä ole niissä aikapisteissä, joissa näyte on otettu. Neljä näytettä viikon aikana on kuitenkin tutkimuskäyttöön sopiva määrä.

Työn tuloksien arviointia vaikeutti seerumin sytokiinipitoisuuksien viitearvojen täydellinen puuttuminen. Laajasta tiedonhausta huolimatta emme löytäneet mitään viitearvoihin liittyvää tutkimusta tai artikkelia. Pitoisuuksien muutosten merkityksellisyyden arviointi oli vaikeata, kun emme tieneet mikä on kunkin sytokiinin normaali vaihteluväli. Jouduimme siten tarkastelemaan ryhmien välisiä pitoisuuksia ja niiden muutoksia arvioimatta erikseen absoluuttisen pitoisuuden merkitystä.

Tämän työn perusteella Veripalvelu on saanut hyödyllistä tietoa ja käytännön kokemusta Milliplex™ MAP High Sensitivity Human Cytokine -reagenssipakkauksen käytettävyydestä. Veripalvelun ulkopuoliset tutkimusryhmät ovat olleet kiinnostuneita tämän menetelmän ja reagenssipakkauksen käytöstä omissa projekteissaan. Tämä tutkimus lisätäänkin mahdollisesti tulevaisuudessa Veripalvelun tutkimusvalikoimaan. Työstäm-

me saadut kokemukset ovat helpottaneet tutkimuksen hinnoittelua ja mahdollista käyttöönottoa. Rinnakkaismääritysten epätasaisuuden vuoksi voisi olla järkevää jatkossa käyttää kolmea rinnakkaista kahden sijasta. Tämä lisäisi tulosten luotettavuutta, mutta samalla tutkimuksen hinta voisi nousta liian korkeaksi.

Työssä saatuja tuloksia ei voi suoraan hyödyntää potilaiden diagnostiikassa. Työn tarkoitus olikin saada pohjatietoa mahdollisia laajempia tutkimuksia varten. Jatkotutkimuksissa voi hyödyntää tämän työn tuloksia ja keskittyä nyt löydettyihin merkityksellisiin sytokiineihin. Tällä hetkellä ohjaajiemme tavoitteena on julkaista tämän työn tuloksista kirjoitettu artikkeli.

Työskentelyssä haasteellisinta oli tulosten käsittely. Ajoittain oli hankalaa hahmottaa kolmen tekijän (ryhmät, aikapisteet ja sytokiinit) muodostamaa koeasetelmaa. Aloitimme analysoinnin käsittelemällä koko aineistoa samanaikaisesti, mutta tämä ei ollut kovin tehokasta aineiston monitahoisuuden takia. Olisimme säästäneet aikaa, jos olisimme heti alussa osanneet pilkkoa aineistoa pienempiin ja helpommin hallittaviin kokonaisuuksiin.

Työskentelymme opinnäytetyön parissa on ollut opettavaista. Olemme onnistuneet projektin aikatauluttamisessa hyvin, etenkin yhdessä työskentely on edennyt sovitusti ja olemme pysyneet asettamassamme aikataulussa. Olemme pääasiassa työskennelleet yhdessä hyvässä ja tuotteliaassa ilmapiirissä. Myös kommunikointi ohjaajien kanssa on sujunut mutkattomasti ja olemme saaneet apua aina tarvittaessa. Laboratorio työn osuus sujui myös hyvässä hengessä kudossopeutuvuuslaboratorion henkilökunnan kanssa. Opinnäytetyöprojekti on siten osaltaan kehittänyt yhteistyötaitojamme paremmiksi.

Uskomme, että tulevaisuudessa sytokiinimääritystä käytetään yhtenä munuaisensiirto-potilaiden seurantamenetelmistä. Siirtyminen menetelmän tutkimuskäytöstä sen diagnostiseen käyttöön vaatii vielä paljon työtä. Työmme ansiosta on kuitenkin saatu lisää tietoa sytokiinien merkityksestä munuaisensiirtossa, ja menetelmä on siten askeleen lähempänä diagnostista käyttöä.

LÄHTEET

- Abbas, Abul K – Lichtman Andrew 2009: Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- About xMAP Technology. 2009. Luminex. Verkkodokumentti.
<<http://www.luminexcorp.com/technology/index.html>>. Luettu 25.11.2009.
- Amend, William – Vincenti, Flavio – Tomlanovich, Stephen 2001: The First Two Post-transplant Months. Teoksessa Danovitch, Gabriel M. (toim.): Handbook of Kidney Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 163–181.
- Eklund, Björn 2002: Munuaisensiirto. Teoksessa Nurmi, Martti – Lukkarinen, Olavi – Ruutu, Mirja – Taari, Kimmo – Tammela, Teuvo (toim.): Urologia. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 154–161.
- Elshal, Mohamed – McCoy, Philip 2006: Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA. Methods. 3 (4). 317–323.
- Fraser, Sheila – Rajasundaram, Rajaganeshan – Aldouri, Amer – Farid, Shahid – Morris-Stiff, Gareth – Baker, Richard – Newstead, Charles – Toogood, Giles – Menon, Krishna – Ahmad, Niaz 2010: Acceptable Outcome After Kidney Transplantation Using "Expanded Criteria Donor" Grafts. Transplantation 89 (1). 88–96.
- HE 276/2009 vp 2009: Hallituksen esitys Eduskunnalle laeiksi ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä annetun lain, sosiaali- ja terveydenhuollon asiakasmaksuista annetun lain 5 §:n ja sairausvakuutuslain 7 luvun 4 §:n muuttamisesta. Verkkodokumentti.
<<http://www.eduskunta.fi>>. Luettu 24.1.2010.
- Heikkilä, Tarja 1998: Tilastollinen tutkimus. Helsinki. Oy Edita Ab.
- Helderman, Harold J – Goral, Simin 2001 : Transplantation Immunobiology. Teoksessa Danovitch, Gabriel M. (toim.): Handbook of Kidney Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 17–38.
- Hoffman, S.A. – Wang, L. – Shah, C.V. – Ahya, V.N. – Pochettino, A. – Olthoff, K – Shaked, A. – Wille, K. – Lama, V.N. – Milstone, A. – Ware, L.B. – Orens, J. – Weinacker, A. – Demissie, E. – Bellamy, S. – Kawut, S.M. – Hancock, W.W. – Christie, J.D. 2009: Plasma Cytokines and Chemokines in Primary Graft Dysfunction Post-Lung Transplantation. American Journal of Transplantation 9 (2). 389–396.
- Hu, Huaizhong – Knechtle, Stuart 2006: Elevation of multiple cytokines/chemokines in urine of human renal transplant recipients with acute and chronic injuries: potential usage for diagnosis and monitoring. Transplantation Reviews 20. 165–171.
- Huhtamies, Mikko – Relander, Jukka 1997: Suomen elinsiirtojen historia. Recallmed Oy. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä.

- Huurman, V.A.L. – Velthuis, J.H.L. – Hilbrands, R. – Tree, T.I.M. – Gillard, P. – van der Meer-Prins, P.M.W. – Duinkerken, G. – Pinkse, G.G.M. – Keymeulen, B. – Roelen, D.L. – Claas, F.H.J. – Pipeleers, D.G. – Roep, B.O. 2009: Allo-graft-Specific Cytokine Profiles Associate with Clinical Outcome After Islet Cell Transplantation. *American Journal of Transplantation* 9 (2). 382–388.
- Jalanko, Hannu 2009: Elinsiirto. Lääkärikirja Duodecim. Verkkodokumentti. Päivitetty 1.12.2009.
<[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00116](http://www terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00116)>
. Luettu 2.2.2010.
- Jimenez, Rosario – Ramirez, Rafael – Carracedo, Julia – Aguera, Marisa – Navarro, Dolores – Santamaria, Rafael – Perez, Rodrigo – Del Castillo, Domingo – Aljama, Pedro 2005: Cytometric bead array (CBA) for the measurement of cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection. *Cytokine* 32 (1). 45–50.
- Julkunen, Ilkka – Silvennoinen, Olli – Hurme, Mikko 2007: Sytokiinit, niiden toiminta ja kliininen merkitys. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 734–747.
- Karczewski, M – Karczewski, J – Poniedzialek, B – Wiktorowicz, K – Smietanska, M – Glyda, M 2009: Distinct Cytokine Patterns in Different States of Kidney Allograft Function. *Transplantation Proceedings* 41 (10). 4147–4149.
- Khan, Sameena – Smith, Meghan – Reda, Debra – Suffredini, Anthony – McCoy, Philip 2004: Multiplex Bead Array Assays for Detection of Soluble Cytokines: Comparison of Sensitivity and Quantitative Values Among Kits From Multiple Manufacturers. *Clinical Cytometry*. 61B. 35–39.
- Kliiniset laboratoriotutkimukset. 2008. SPR Veripalvelu. Verkkodokumentti.
<http://www.terveysportti.fi/kotisivut/sivut.koti?p_sivusto=906>. Luettu 16.11.2009.
- Kokko, Kenneth – Lakkis, Fadi 2000: Role of Cytokines and Chemokines. Teoksessa Tejani, Amir – Harmon, William – Fine, Richard (toim.): *Pediatric Solid Organ Transplantation*. Copenhagen: Munksgaard. 35–43.
- Kreatiniini, plasmasta. 2009. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirjat/index.html>>. Luettu 25.1.2010.
- Kuby, Janis 1997: *Immunology*. W.H. Freeman and Company.
- Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä 101/2001. Annettu Helsingissä 2.2.2001.
- Leng, Sean – McElhaney, Janet – Walston, Jeremy – Xie, Dongxu – Fedarko, Neal – Kuchel, George 2008: ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *The Journals on Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 63. 879–884.
- Merenmies, Jussi 2010. Erikoislääkäri. Suomen Punainen Risti Veripalvelu. Helsinki. Suullinen tiedonanto 18.1.

- Meri, Seppo 2007: Johdanto immunologiaan. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 619–623.
- Metsämuuronen, Jari 2004: Pienten aineistojen analyysi. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Milliporen Milliplex™ MAP High Sensitivity Human Cytokine Kit. 2008. Millipore.
- Nast, Cynthia – Cohen, Arthur 2001 : Pathology of Kidney Transplantation. Teoksessa Danovitch, Gabriel M. (toim.): Handbook of Kidney Transplantation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 290–312.
- Neutrofiilin gelatinaasin assosioitunut lipokaliini, plasmasta. 2009. Tutkimusohjekirja. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirjat/index.html>>. Luettu 25.1.2010.
- Partanen, Jukka 2005: HLA-järjestelmä. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 680–691.
- Perico, Norberto – Cattaneo, Dario – Sayegh, Mohamed – Remuzzi, Giuseppe 2004: Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364. 1814–1827.
- Pfaff, William – Howard, Richard – Patton, Pamela – Adams, Val – Rosen, Charles – Reed, Alan 1998: Delayed Graft Function After Renal Transplantation. *Transplantation* 65 (2). 219–223.
- Salmela, Kaija – Höckerstedt, Krister – Salminen, Ulla-Stina – Hämmäinen, Pekka 2004: Elinsiirrot – Käypää hoitoa jo 40 vuoden ajan. *Duodecim* 120 (11). 1359–1369.
- Salmela, Kaija – Kyllönen, Lauri 2003: Kahdella tuhannella suomalaisella toimiva munuaissiirrännäinen. *Suomen lääkirilehti* 52 (5). 507–511.
- Silva, D.M. – Garcia, J.P. – Ribeiro, A.R. – Veronese, F.J. – Edelweiss, M.I. – Gonçalves, L.F. – Manfro, R.C. 2007: Utility of Biopsy in Kidney Transplants With Delayed Graft Function and Acute Dysfunction. *Transplantation Proceedings* 39 (2). 376–377.
- Stevens, Christine Dorresteyn 2003: *Clinical Immunology and Serology*. Philadelphia: F.A. Davis Company.
- Teppo, Anna-Maija 2005: Excretion of urinary proteins as predictors of early posttransplantation complications and late renal allograft failure. Helsinki: Yliopistopaino.
- Transplantation figures. 2009. *Scandiatransplant*. Verkkodokumentti. Päivitetty 23.1.2009. <http://www.scandiatransplant.org/quarter_4_2008.htm>. Luettu 16.11.2009.

SYTOKIINILUETTELO

Työssä määritetyt sytokiinit:

GM-CSF	granulosyytti-makrofagikasvutekijä
IL-10	interleukiini 10
IL-12(p70)	interleukiini 12(p70)
IL-13	interleukiini 13
IL-1 β	interleukiini 1 beta
IL-2	interleukiini 2
IL-4	interleukiini 4
IL-5	interleukiini 5
IL-6	interleukiini 6
IL-7	interleukiini 7
IL-8	interleukiini 8
INF γ	interferoni gamma
TNF α	tuumorinekroositekijä alfa

Muut työssä mainitut sytokiinit:

IFN α	interferoni alfa
IFN β	interferoni beta
IL-1	interleukiini 1
IL-12	interleukiini 12
IL-1Ra	interleukiin 1 reseptorin antagonisti
IL-1 β ra	interleukiini 1 beta reseptorin antagonisti
IL-2R	interleukiini 2 reseptori
IP-10	interferoni-indusoituva proteiini 10
MCP-1	monosyyttikemotaktinen proteiini 1
MIG	interferoni gamman indusoima monokiini
MIP-1 α	makrofagin inflammatorinen proteiini 1 alfa
MIP-1 β	makrofagin inflammatorinen proteiini 1 beta

Reagenssipakkauksen työohje

IMMUNOASSAY PROCEDURE

- Prior to beginning this assay, it is imperative to read this protocol completely and to thoroughly understand the Technical Guidelines.
- Allow all reagents to warm to room temperature (20-25°C) before use in the assay.
- Diagram the placement of Standards [0 (Background), 0.13, 0.64, 3.2, 16, 80, 400, and 2000 pg/mL], Controls 1 and 2, and Samples on Well Map Worksheet in a vertical configuration. (Note: Most instruments will only read the 96-well plate vertically by default.) It is recommended to run the assay in duplicate.
- Set the filter plate on a plate holder at all times during reagent dispensing and incubation steps so that the bottom of the plate does not touch any surface.

1. Prewet the filter plate by pipetting 200 µL of 1X Wash Buffer into each well of the Microtiter Filter Plate. Seal and mix on a plate shaker for 10 minutes at room temperature (20-25°C).
2. Remove Wash Buffer by vacuum. (**NOTE: DO NOT INVERT PLATE.**) Blot excess Wash Buffer from the bottom of the plate with an absorbent pad or paper towels.
3. Sonicate bead bottle for 30 seconds and then vortex for minute. Add 25 µL of the Mixed or Premixed Beads to each well. (Note: During addition of Beads, shake bead bottle intermittently to avoid settling.)
4. Remove liquid from the wells by vacuum. (**Note: DO NOT INVERT PLATE.**) Blot excess liquid from the bottom the plate by with an absorbent pad or paper towels.
5. Add 50 µL of each Standard or Control into the appropriate wells. Assay Buffer should be used for the 0 pg/mL standard (Background).
6. Add 50 µL of Assay Buffer to sample wells.
7. Add 50 µL of appropriate matrix solution to the background, standards, and control wells. When assaying serum or plasma, use the Serum Matrix provided in the kit. When assaying tissue culture supernatant samples, use proper control culture medium as the matrix solution.
8. Add 50 µL of Sample into the appropriate wells. Before addition to wells, the samples should be centrifuged to remove any precipitates or denatured proteins that occurred during storage and handling.

Add 200 µL 1X Wash Buffer per well

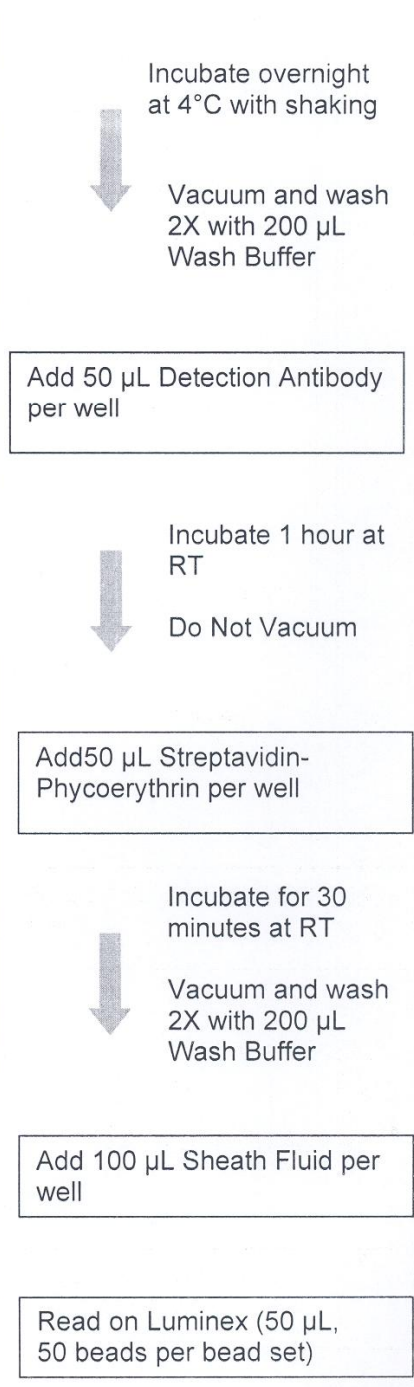


Shake 10 min, RT

Vacuum

- Add 25 µL Beads to each well then vacuum
- Add 50 µL Standard or Control to appropriate wells
- Add 50 µL Assay Buffer to background and sample wells
- Add 50 µL Matrix to background, standards and control wells
- Add 50 µL Samples to sample wells

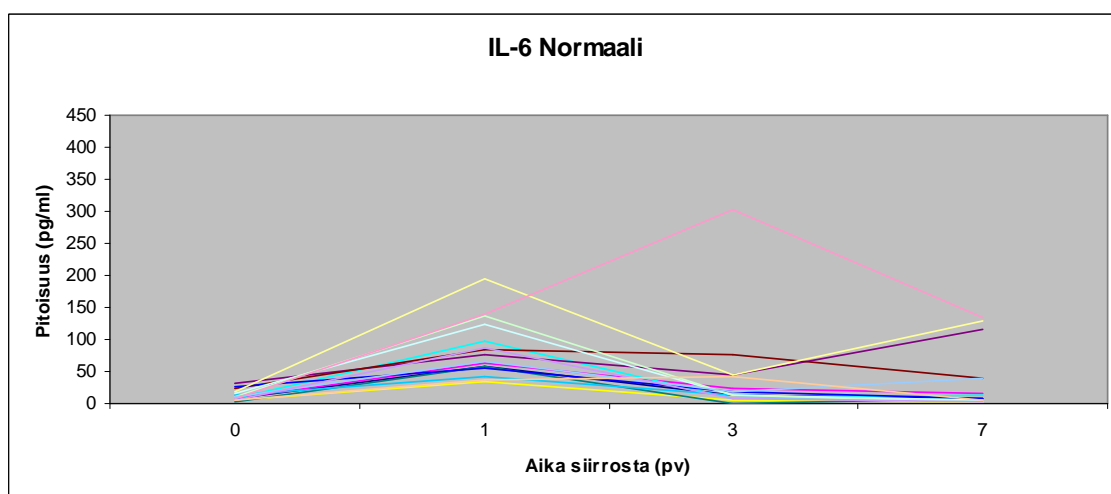
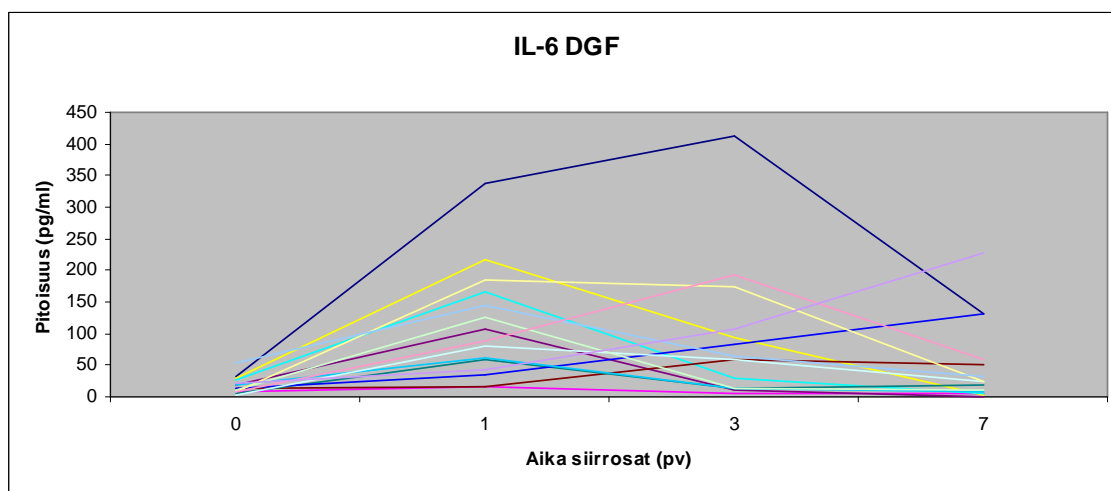
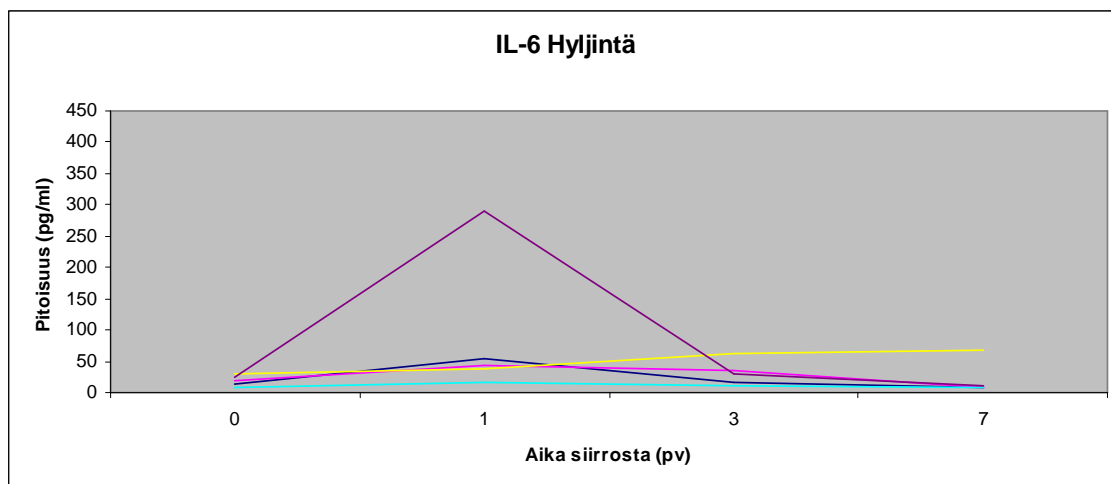
9. Seal the plate with a plate sealer, cover it with the lid. Wrap a rubber band around the plate holder, plate and lid and incubate with agitation on a plate shaker overnight (16-18 hours) at 4°C.
10. Gently remove fluid by vacuum. **(NOTE: DO NOT INVERT PLATE.)**
11. Wash plate 2 times with 200 µL/well of Wash Buffer, removing Wash Buffer by vacuum filtration between each wash. Blot excess Wash Buffer from the bottom the plate by with an absorbent pad or paper towels.
12. Add 50 µL of Detection Antibodies into each well. (Note: Allow the Detection Antibodies to warm to room temperature prior to addition.)
13. Seal, cover with lid, and incubate with agitation on a plate shaker for 1 hour at room temperature (20-25°C). **DO NOT VACUUM AFTER INCUBATION.**
14. Add 50 µL Streptavidin-Phycoerythrin to each well containing the 50 µL of Detection Antibodies.
15. Seal, cover with lid and incubate with agitation on a plate shaker for 30 minutes at room temperature (20-25°C).
16. Gently remove all contents by vacuum. **(NOTE: DO NOT INVERT PLATE.)**
17. Wash plate 2 times with 200 µL/well Wash Buffer, removing Wash Buffer by vacuum filtration between each wash. Wipe any excess buffer on the bottom of the plate with a tissue.
18. Add 100 µL of Sheath Fluid to all wells. Resuspend the beads on a plate shaker for 5 minutes.
19. Run plate on Luminex 100™ IS, 200™, or HTS.
20. Save and analyze the Median Fluorescent Intensity (MFI) data using a weighted 5-parameter logistic or spline curve-fitting method for calculating cytokine/chemokines concentrations in samples.

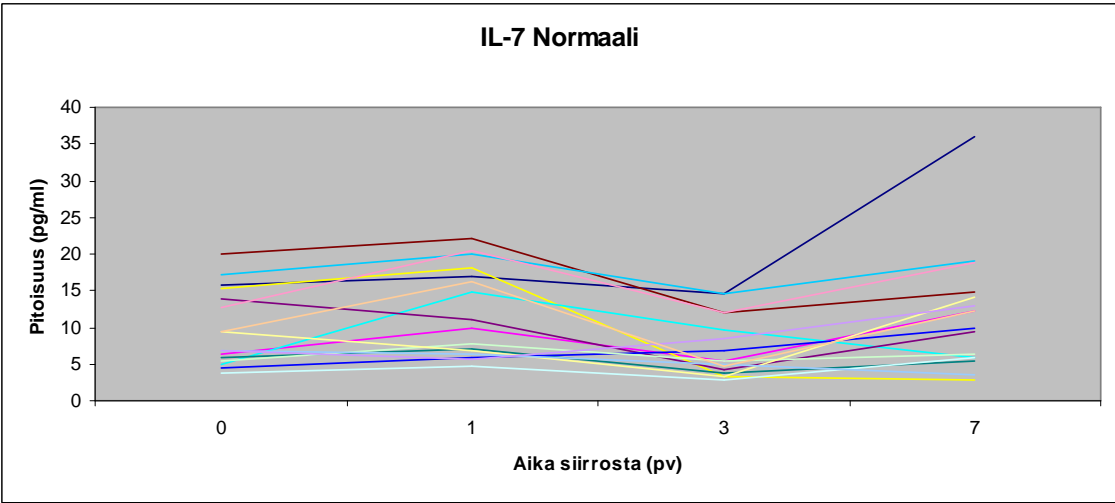
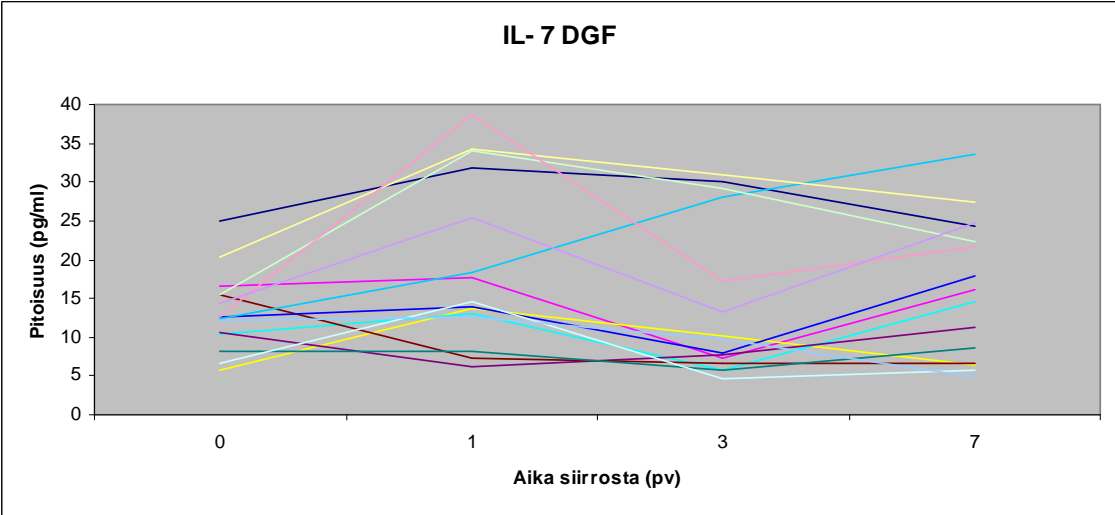
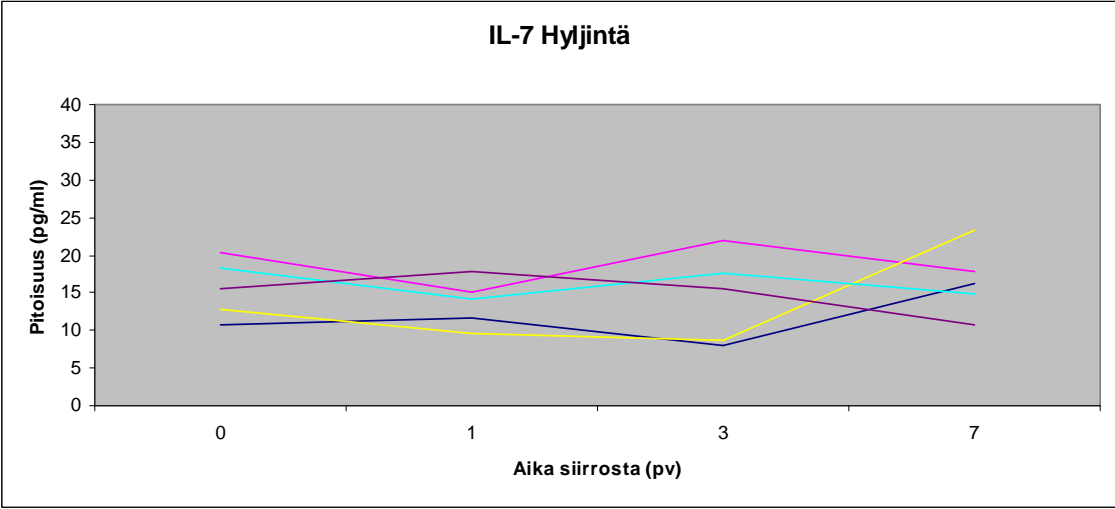


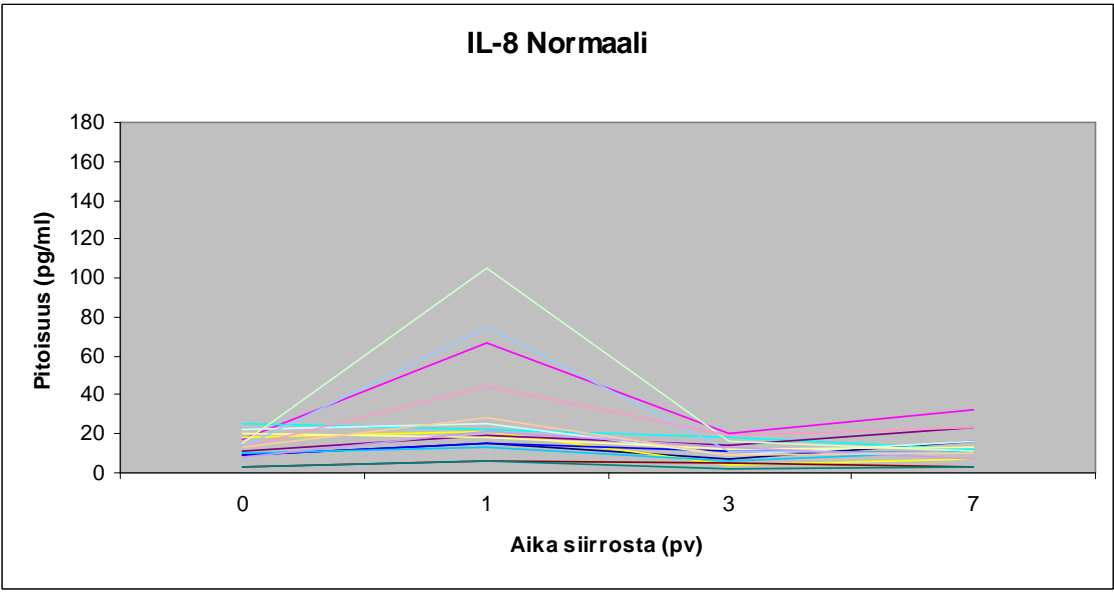
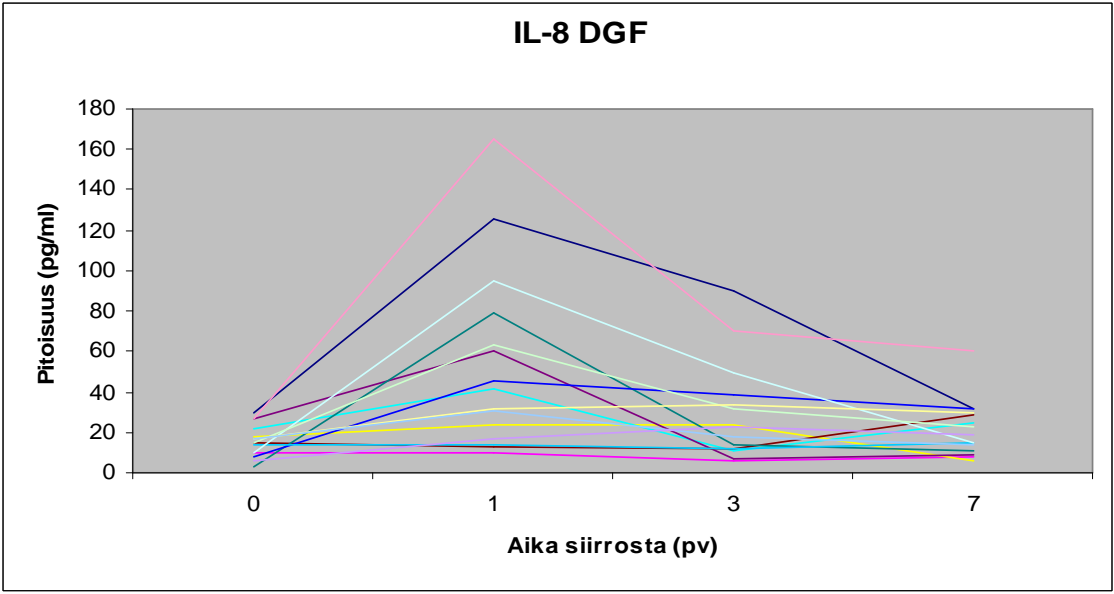
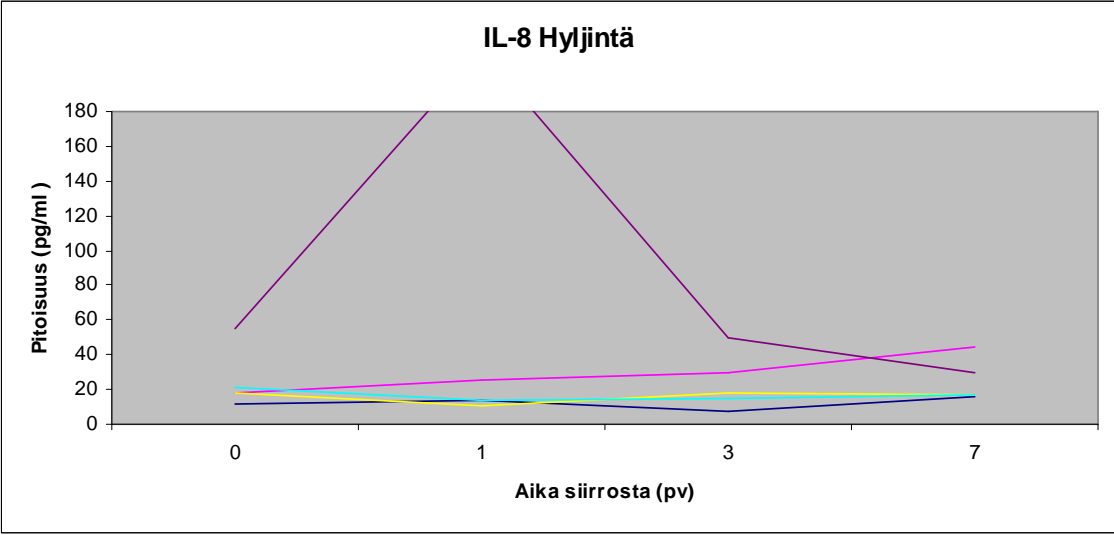
Taulukko sytokiinipitoisuuksien mediaaneista ryhmittäin ja aikapisteittäin

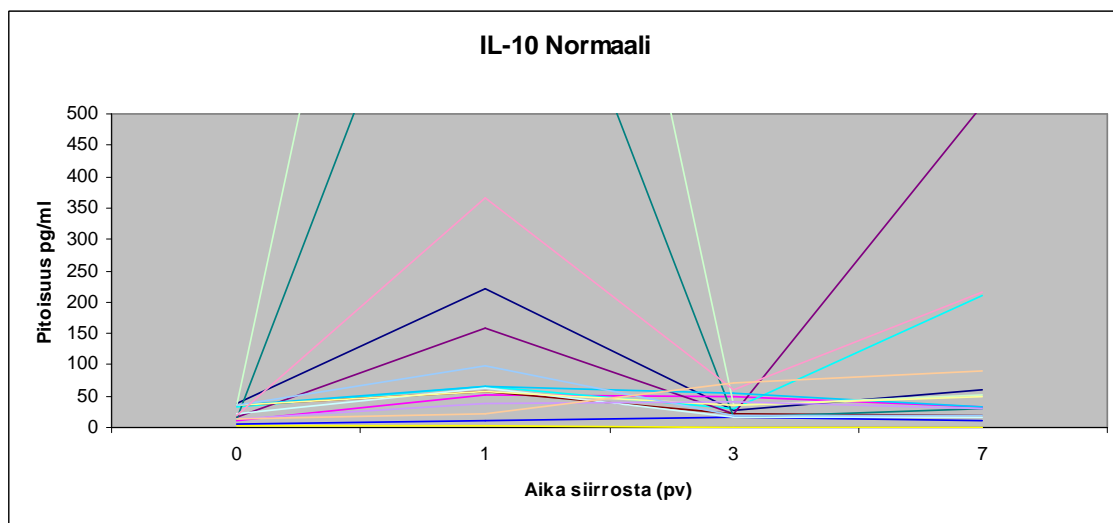
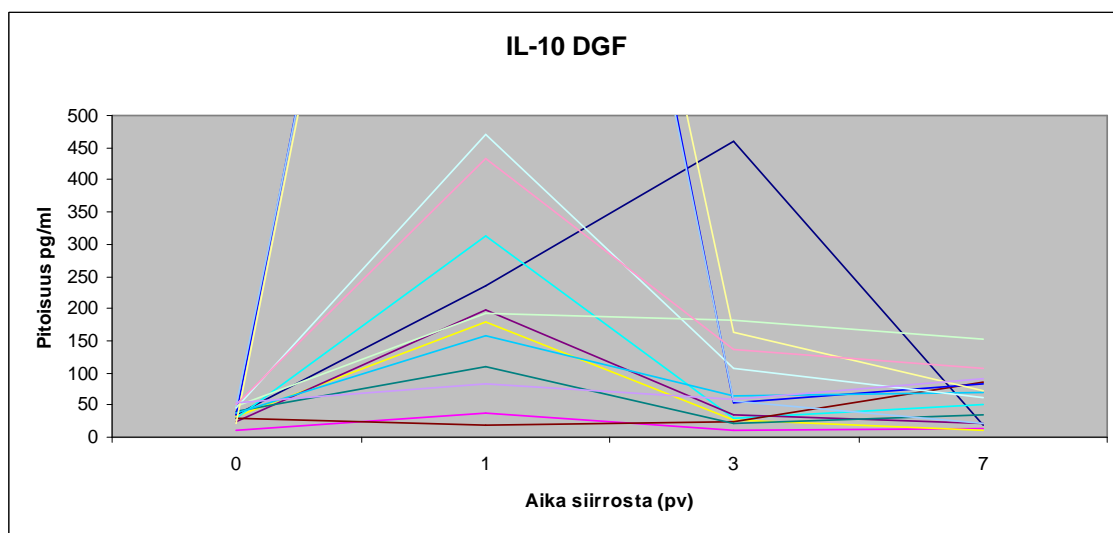
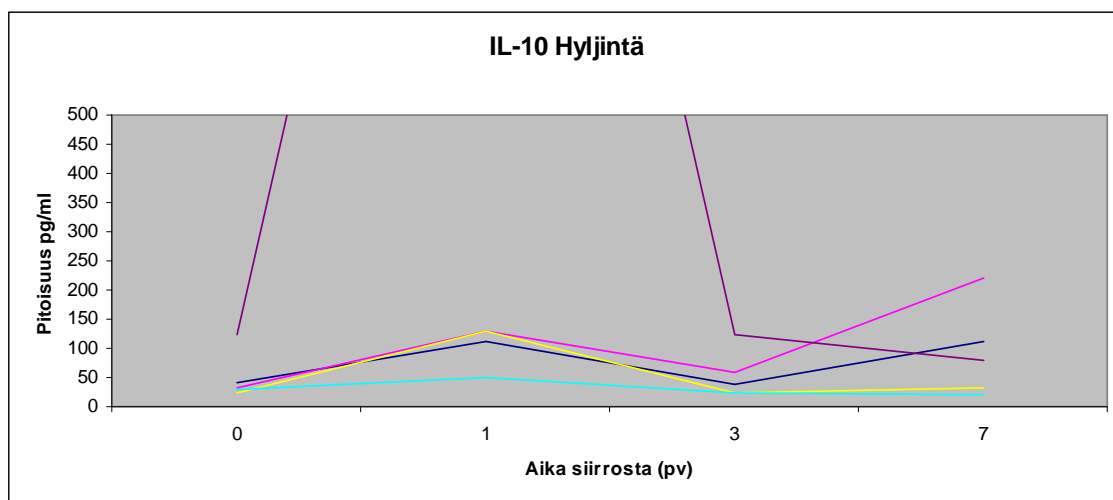
	Ryhmä	0	1	3	7
IL-1 β	Hyljintä	0,46	0,22	0,18	0,21
	DGF	0,53	0,26	0,42	0,31
	Normaali	0,39	0,23	0,22	0,25
IL-2	Hyljintä	1,01	0,77	1,34	1,66
	DGF	0,62	0,75	2,41	1,46
	Normaali	1,00	0,88	1,24	0,91
IL-4	Hyljintä	4,62	2,05	3,58	2,53
	DGF	3,55	3,80	4,43	4,69
	Normaali	3,97	4,77	4,31	4,87
IL-5	Hyljintä	0,73	0,39	0,59	0,45
	DGF	0,33	0,14	0,29	0,24
	Normaali	0,49	0,20	0,22	0,23
IL-6	Hyljintä	19,27	48,51	32,52	7,52
	DGF	12,98	94,31	58,89	18,12
	Normaali	10,30	71,19	18,45	7,65
IL-7	Hyljintä	14,16	12,92	12,03	16,32
	DGF	12,52	15,80	9,81	16,09
	Normaali	8,09	10,55	6,15	12,23
IL-8	Hyljintä	18,04	18,74	22,96	17,25
	DGF	15,17	43,67	22,78	18,38
	Normaali	13,03	21,16	11,60	11,45
IL-10	Hyljintä	37,77	129,72	49,02	80,11
	DGF	33,50	216,66	58,14	60,45
	Normaali	17,81	63,50	29,66	33,22
IL-12(p70)	Hyljintä	1,00	--	--	--
	DGF	1,44	0,96	1,05	0,47
	Normaali	2,21	1,76	1,63	1,10
IL-13	Hyljintä	3,07	1,44	1,32	2,63
	DGF	1,80	1,60	1,92	2,11
	Normaali	1,60	2,92	2,02	2,25
GM-CSF	Hyljintä	2,61	1,98	2,45	2,52
	DGF	1,79	3,72	1,79	1,94
	Normaali	0,97	1,24	2,31	1,64
IFN γ	Hyljintä	3,11	1,39	3,11	1,65
	DGF	5,55	1,42	1,70	2,03
	Normaali	2,78	1,04	2,23	1,23
TNF α	Hyljintä	31,53	21,68	16,19	34,48
	DGF	31,68	25,91	23,59	22,45
	Normaali	22,96	13,97	10,07	10,15

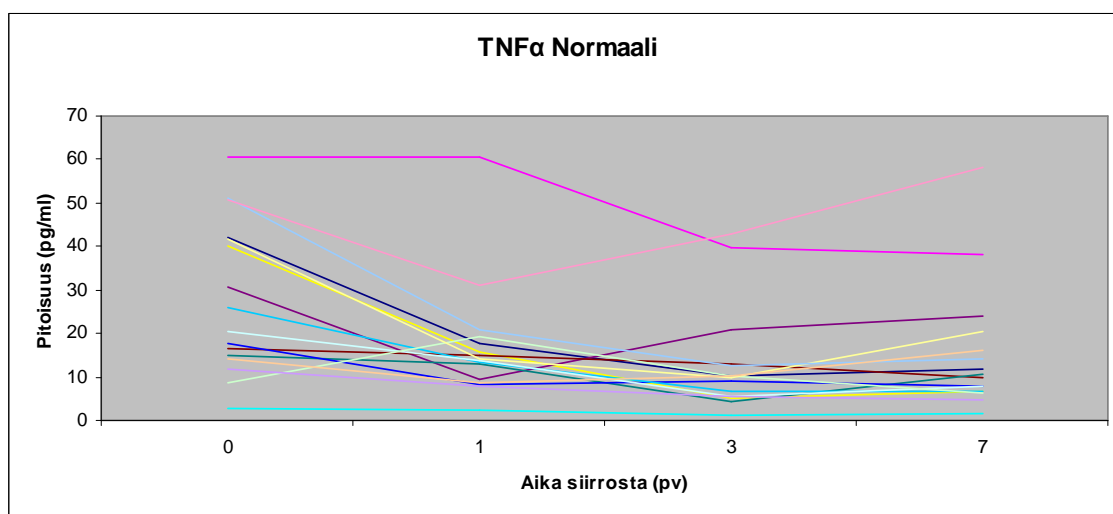
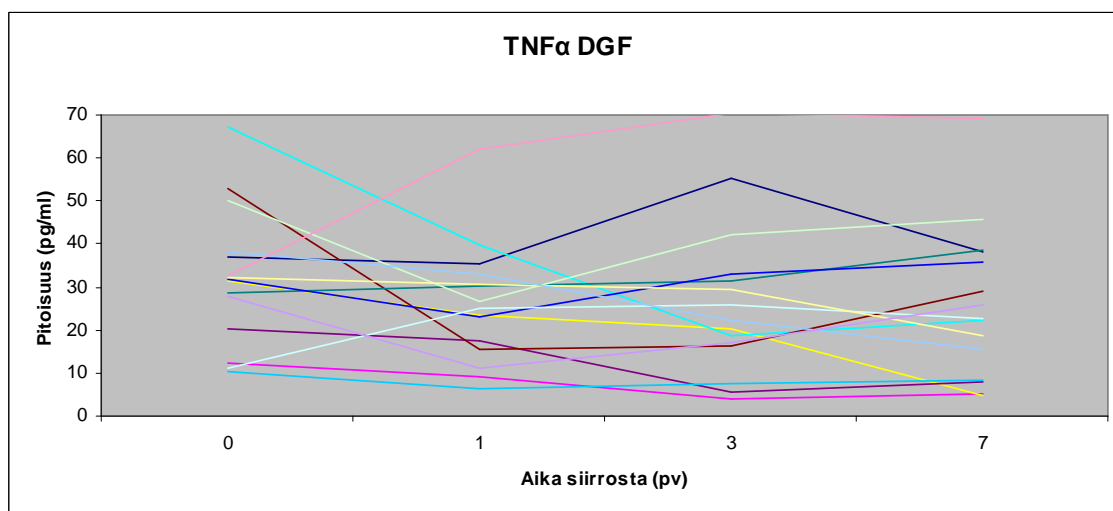
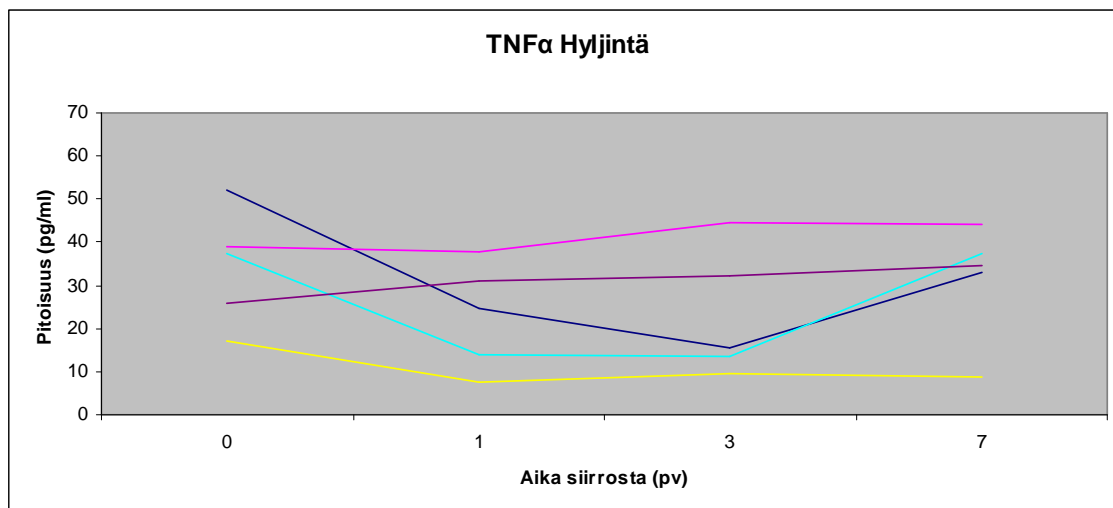
Kaikkien näytteiden sytokiinipitoisuudet ryhmittäin ja aikapisteittäin











Kontrollien rinnakkaismäärittysten pitoisuudet sekä tavoitearvot

